

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

Scuola di Specializzazione in Cardiologia

Direttore Prof. Alberto Balbarini

**FISIOPATOLOGIA DEL RIMODELLAMENTO ELETTROMECCANICO
CARDIOMIOCITARIO NELLA CARDIOMIOPATIA IPERTROFICA
OSTRUTTIVA**

Relatore:

Chiar.mo Prof.

Alberto Balbarini

Specializzando:

Dott.ssa Alessandra Rossi

Anno Accademico 2010/2011

INDICE

Introduzione.....pag. 1

Materiali e Metodi.....pag. 9

Risultati.....pag. 14

Discussione.....pag. 19

Bibliografia.....pag. I-VII

INTRODUZIONE

Le malattie cardiovascolari rappresentano la prima causa di morte, disabilità e morbidità in Europa e negli Stati Uniti, ed i costi sanitari associati ad esse sono enormi. Ci sono cause acquisite e genetiche alla base delle patologie cardiovascolari, e molte di queste malattie sono multifattoriali, risultato dell'interazione tra fattori ambientali e genetici. Tuttavia, esistono patologie cardiovascolari determinate da un preciso disturbo genetico, trasmesse con modalità Mendeliana. La cardiomiopatia ipertrofica (HCM) è la più frequente malattia cardiovascolare geneticamente determinata da singola mutazione, con un'incidenza di 1:500 (1) e una prevalenza di circa 4 milioni di persone tra Europa e Stati Uniti.

La HCM è una malattia autosomica dominante, che determina ipertrofia del ventricolo sinistro in assenza di altre cause cardiache o malattie sistemiche, quali ipertensione o stenosi aortica. Morfologicamente il ventricolo sinistro presenta ipertrofia della parete e del setto interventricolare e ridotto volume della camera.

In particolare, l'ipertrofia ventricolare sinistra si sviluppa durante la pubertà o in giovane età, ma può essere presente alla nascita o sviluppare tardivamente intorno alla sesta decade di vita (1). La distribuzione dell'ipertrofia nella HCM è tipicamente regionale e asimmetrica, potendo virtualmente interessare diversi segmenti del ventricolo sinistro (2), e talora coinvolge il ventricolo destro ed i muscoli papillari. Il passaggio tra porzioni ipertrofiche e non è tipicamente netto, determinando un profilo 'globoso' (lumpy) della parete ventricolare. Per ragioni non note, il setto basale anteriore e la parete anterolaterale sono più spesso coinvolti, e generalmente rappresentano il sito di massimo spessore (3). Il range di spessore oscilla da forme lievi (13-15mm) all'estrema ipertrofia (30mm o più), con una media tra 21 e 23 mm in una significativa coorte di pazienti ipertrofici (4,5). L'ostruzione del tratto di efflusso del ventricolo sinistro è presente in circa il 25% dei pazienti a riposo, e in più alta percentuale durante esercizio.

Dal punto di vista istologico, aree di disarray miocitario e di fibrosi interstiziale sono tipiche della malattia. Sebbene non riscontrabile solo nella HCM, il disarray è considerato la quintessenza della patologia ipertrofica, ed è praticamente identificabile sempre all'autopsia o su campioni di tessuto dopo miectomia. (6). Il disarray può essere definito come una disorganizzazione dell'allineamento dei miociti, con perdita del fisiologico orientamento in parallelo delle cellule. Le conseguenze funzionali del disarray possono affliggere la meccanica del ventricolo sinistro interferendo con la fisiologica omogeneità della contrazione-rilasciamento (7) e rappresentare un potenziale substrato per aritmie ventricolari (6).

Patterns variabili e talvolta estesi di fibrosi intra-miocardica sono stati descritti sia in studi di base su cuori ipertrofici (6), sia più recentemente attraverso tecniche di Risonanza Magnetica Cardiaca (CMR), consentendo in vivo la visualizzazione di aree di late gadolinium enhancement (LGE) (3,8). Immagini di LGE

alla CMR sono presenti in circa due terzi dei pazienti HCM, come immagini infarct-like, di estensione variabile da limitata ad estesa, talvolta confluenti potendo interessare porzioni significative del ventricolo sinistro (8). LGE si localizza preferenzialmente nelle aeree maggiormente ipertrofiche del ventricolo, spesso rappresentate dal setto medio e basale, ed è frequentemente riscontrato nei pazienti con diffusa e severa ipertrofia. Evidenze preliminari interpretano le aeree di LGE come potenziali substrati per aritmie ventricolari (9).

Un'altra caratteristica fisiopatologica della HCM è rappresentata dalla disfunzione microvascolare. Nello scorso decennio, diversi studi hanno dimostrato che nei pazienti affetti da HCM, la riserva vascolare coronarica è marcatamente ridotta non solo a livello del setto ipertrofico, ma anche della parete libera ipertrofica del ventricolo sinistro (10, 11). In assenza di stenosi coronariche epicardiche significative, questi riscontri sono indicativi di diffusa disfunzione microvascolare, in linea con l'evidenza patologica di un marcato e diffuso remodeling delle arteriole coronariche intramurali (6), che mostrano iperplasia muscolare liscia e disorganizzazione della fibre elastiche con conseguente deformazione ed irregolare restringimento del lume vascolare. La disfunzione microvascolare è uno dei più importanti substrati per l'ischemia ricorrente nei pazienti HCM, ed è stato dimostrato essere un importante fattore sfavorevole sull'outcome a distanza e sul remodeling negativo (10,11).

Sebbene la contrattilità sistolica sia preservata, e l'ipercinesia caratterizzi la cinetica globale dei cuori HCM, l'ostruzione all'efflusso e la disfunzione diastolica possono progressivamente determinare un quadro di insufficienza cardiaca ed un aumento dell'incidenza di aritmie ventricolari, queste ultime all'origine dei casi di morte improvvisa.

È curioso il comportamento del difetto genetico della HCM, in quanto pur presente dalla nascita, può essere compensato in quasi tutti i pazienti fino all'adolescenza e oltre, talvolta non esprimendosi fino al termine della vita, come indicativo di un'incompleta penetranza. Alcune mutazioni hanno un'elevata penetranza, mentre altre appaiono incomplete. Inoltre, è stato riscontrato che alcuni portatori di mutazioni HCM possono presentare una brusca transizione dall'avere cuori strutturalmente normali progredendo verso forme di franca cardiomiopatia ipertrofica nella vita adulta. Sembra importante considerare questo comportamento variabile, perché potrebbe suggerire l'esistenza di un momento di svolta nell'espressione delle mutazioni responsabili della malattia, oltre il quale si verifica l'espressione e la progressione clinica della cardiomiopatia. Le condizioni fisiologiche e metaboliche che determinano questa 'svolta' potrebbero essere manipolate per prevenire le patologiche conseguenze dell'espressione della malattia e specifici interventi potrebbero modificare o potenzialmente trattare il processo patologico risultandone quindi un beneficio terapeutico. Tuttavia non esistono al momento terapie o trattamenti adeguati a prevenire lo sviluppo di malattia nei soggetti portatori di mutazioni.

Quindi appare chiaro dall'introduzione, che nonostante i notevoli progressi conoscitivi sulla fisiopatologia della cardiomiopatia ipertrofica, un'efficace terapia non è ancora disponibile per ridurre sostanzialmente i rischi clinici della medesima.

Nel 1990 la prima mutazione missense in una proteina sarcomerica, R403Q della β -miosina heavy chain (β -MyHC) è stata scoperta essere responsabile della HCM (12). Da allora, la genetica molecolare ha dimostrato che la HCM è una patologia molecolare complessa, mostrando geni ed alleli diversi alla base della malattia (multipli geni e multiple mutazioni), con almeno 10 geni sarcomerici coinvolti e più di 400 mutazioni (prevalentemente missense) descritte. Accanto alla β -MyHC, altri geni, correlati alla malattia, codificano per le proteine dei filamenti spessi (i): miosina legante la proteina C (cMyBP-C, o C-protein), la miosina a catena leggera sia la componente regolatoria (RCL) che essenziale (ELC), e per le proteine dei filamenti leggeri (ii): α -tropomiosina (α -Tm), Troponina T (cTnT), Troponina I, Troponina C (cTnI), actina, e le proteine giganti (iii) come la titina tra i filamenti spessi e sottili. Mutazioni delle proteine sarcomeriche, responsabili della malattia sono identificati nel 60-70% dei casi di HCM, e più comunemente affetti sono i geni MYBPC3 (cMyBP-C) e MYH7 (β -MyHC). La prevalenza delle mutazioni delle proteine sarcomeriche ha comportato la definizione della HCM come 'malattia primariamente del sarcomero' (13,14,15). La conoscenza della base genetica della malattia, impone l'interrogativo su quanto i difetti genetici delle proteine del sarcomero interferiscano sull'eterogeneità dell'espressione fenotipica che caratterizza la HCM. Infatti, l'ipertrofia asimmetrica del ventricolo sinistro, la disfunzione diastolica e la morte improvvisa sono tre manifestazioni note della HCM, ma la malattia mostra un ampio spettro di espressioni cliniche, che includono anche il 'fenotipo pre-ipertrofico' (pre-hypertrophic phenotype). I portatori sani di mutazioni sarcomeriche durante la fase pre-ipertrofica spesso presentano anomalie ecocardiografiche minime, ma non necessariamente svilupperanno una franca ipertrofia e/o sintomatologia. Il remodeling atriale (e dilatazione atriale) e le alterazioni dell'apparato valvolare mitralico (sproporzionata lunghezza dei lembi mitralici, anomalie delle corde tendinee e/o dei muscoli papillari, l'inserzione dei muscoli stessi e le anomalie papillari in termini di numero e locazione) sono comuni nei pazienti con HCM manifesta, e sono pure descritti in pazienti con ipertrofia minima o non ipertrofici. Attualmente non viene attuata alcuna terapia nella fase pre-ipertrofica per prevenire lo sviluppo dell'ipertrofia; con la maggior disponibilità di screening genetico per le mutazioni HCM correlate, il numero di portatori di mutazioni genotipo-positivo senza ipertrofia cardiaca è in aumento: nella popolazione studiata presso il Centro di riferimento per le Cardiomiopatie Ipertrofiche di Firenze circa 200 parenti non malati di pazienti sono risultati portatori. Un trattamento adeguato a prevenire lo sviluppo dell'ipertrofia potrebbe, quindi, essere applicabile a diversi soggetti e la mancanza di un farmaco efficace in questo senso appare come una mancata possibilità terapeutica.

Le alterazioni della funzione diastolica determinabili con metodica Tissue Doppler (alterato riempimento del ventricolo sinistro) sono le prime variazioni della disfunzione miocardica in portatori di mutazioni HCM

correlate senza ipertrofia, sia in animali che negli uomini (7,16). L'origine della disfunzione diastolica nei pazienti HCM è multifattoriale e complessa, con modificazioni a livello cellulare (es alterata funzione del sarcomero e del Ca^{2+} handling) ed anomalie tissutali (disarray miocitario, fibrosi interstiziale e disfunzione microvascolare). Altri fattori morfologici, come la forma e la geometria ventricolare, possono intervenire nel ridurre la distensibilità del ventricolo e alterare il rilasciamento. Inoltre, la disfunzione diastolica è il principale determinante di sintomi nei pazienti con Cardiomiopatia Ipertrofica: ridotta resistenza allo sforzo, dolore toracico e discomfort, episodi di dispnea, sono tutti associati all'alterato rilasciamento miocardico, che determina un aumento delle pressioni di riempimento ventricolari e un incremento delle pressioni atriali con associata dilatazione ed aumentato rischio di fibrillazione atriale (28). Quasi tutte le cause di disfunzione diastolica nella HCM sono, almeno parzialmente, note ma non esiste una specifica terapia che determini un miglioramento del rilasciamento ventricolare in questi pazienti. Studi recenti eseguiti con PET in questi pazienti hanno chiaramente dimostrato la presenza di anomalie microvascolari (es fibrosi), che causano un ridotto flusso ematico al miocardio, e che sono fattori prognostici negativi. Oltre alla fibrosi microvascolare, anche l'alterato rilasciamento miocardico e il conseguente aumento di pressione tissutale del ventricolo sinistro durante la diastole possono contribuire alla compromissione del flusso ematico tissutale. Il controllo della disfunzione diastolica con un'appropriata e specifica terapia potrebbe non solo ridurre i sintomi di questi pazienti, ma prevenire anche il progressivo peggioramento e l'insorgenza di insufficienza cardiaca. Come già descritto, la disfunzione diastolica è una caratteristica precoce, che spesso convive con una funzione sistolica globalmente conservata. La disfunzione sistolica è un evento relativamente raro nella HCM (la prevalenza di insufficienza cardiaca e di progressione verso un "end stage" è < 1%), e si verifica generalmente in fase tardiva nel corso della progressione della malattia; tuttavia la disfunzione sistolica rappresenta una causa importante di mortalità in questa popolazione di pazienti, seconda solo ai casi di morte improvvisa.

Quindi, le alterazioni della diastole sono tra le primi segni di cardiomiopatia ipertrofica ancor prima che si sviluppi un'evidente ipertrofia, i cosiddetti HCM preclinici. Le metodiche ecocardiografiche Doppler (TDI) e l'analisi strain, consentono di caratterizzare questo stadio preclinico di malattia. Il TDI misura la velocità del miocardio in sistole (S'), diastole precoce (E') e la contrazione atriale (A'). La velocità E' riflette la funzione diastolica, e quando ridotta è indicativa di un alterato rilasciamento. Acquisendo misure in TDI in una popolazione di pazienti genotipizzati, l'alterato rilasciamento può essere identificato in una fase preclinica, prima dell'espressione di una evidente ipertrofia ventricolare. Questo fenomeno è stato consistentemente dimostrato in soggetti HCM preclinici. Individui con HCM preclinica presentano una significativa riduzione della velocità E' al TDI paragonati ad una popolazione di controllo (7,16). I soggetti con patologia manifesta hanno più gravi alterazioni della funzione diastolica. Quanto detto indica come esista una disfunzione miocardica subdola prima dello sviluppo di ipertrofia cardiaca in soggetti con HCM preclinica.

In condizioni di riposo, l'ostruzione all'efflusso ventricolare sinistro è presente nel 20-30% dei casi di HCM (1). In una certa percentuale di pazienti, intorno al 40% un gradiente ≥ 50 mmHg può essere evocato con l'esercizio (17). L'ostruzione all'efflusso ventricolare sinistro (LVOTO) si verifica classicamente a livello subaortico, principalmente riferibile al movimento sistolico anteriore della mitrale (SAM) che causa un contatto sistolico con il setto ipertrofico, e conseguente ostruzione mesosistolica del LVOT. Il SAM è determinato da 'forze di trascinamento' (drag force), che derivano dal flusso sistolico anormale ad alta velocità diretto anteriormente all'interno del ventricolo sinistro, che incontra e 'trascina' verso il tratto di efflusso il lembo anteriore mitralico, in genere di lunghezza aumentata; il concomitante rigurgito mitralico si verifica per perdita della coaptazione dei lembi valvolari (18). In pazienti HCM ogni gradiente > 30 mmHg in condizioni di riposo è considerato indicativo per la presenza di ostruzione all'efflusso di significato clinico; comunque, in presenza di un SAM di grado elevato che produca un prolungato contatto settale sistolico, il gradiente massimo a riposo può superare 150mmHg (19). Nei pazienti giovani, l'ostruzione è dinamica e varia drammaticamente nelle diverse condizioni fisiologiche. I pazienti più anziani presentano comunemente una deformazione sigmoide del setto ipertrofico, che determina una riduzione anatomica dell'area subaortica; in questi casi anche un SAM di grado lieve-moderato può causare un'ostruzione severa, che varia poco al variare delle condizioni di esercizio. In conclusione, l'ostruzione al tratto di efflusso è una delle cause dei sintomi nella HCM, insieme alla disfunzione diastolica. Le opzioni farmacologiche per il trattamento dell'ostruzione sono in numero limitato e l'opzione chirurgica (intervento di miectomia estesa del setto) è l'unica possibilità di sicura risoluzione dei sintomi da ostruzione in un'alta percentuale di pazienti. Un farmaco efficace sull'ostruzione appare quindi necessario al bagaglio terapeutico, anche se ancora disatteso.

La morte improvvisa (Sudden Death-SD) si verifica nell'1-2% dei pazienti HCM e l'identificazione dei pazienti a più alto rischio rimane una sfida importante. La SD nei pazienti HCM è correlata alle aritmie, primariamente alla tachicardia ventricolare/fibrillazione (VT/FV) (20), e in relazione con l'età del paziente (1). La SD può verificarsi in qualunque età, ma il picco di incidenza si verifica durante l'adolescenza e in giovani adulti, più comunemente tra i 25-30 aa di età. Quindi, l'HCM è adesso riconosciuta come la più comune causa di SD nei giovani (22). Comunque, il rischio di SD prosegue fino all'età media (ed anche oltre), sebbene con una minor frequenza, e l'assoluta immunità dal rischio di SD nei pazienti con HCM non è mai raggiunta. Tuttavia, oltre i 60aa di età, la SD riferibile alla cardiomiopatia ipertrofica (in assenza di malattia aterosclerotica coronarica) appare poco comune. La morte improvvisa è spesso la manifestazione iniziale in giovani asintomatici, alcuni senza diagnosi in vita. Sebbene alcuni pazienti muoiano improvvisamente durante il riposo o in corso di un normale o modesto esercizio fisico, una percentuale importante di soggetti cade durante l'esercizio estremo, inclusi giovani atleti durante competizioni sportive. Fortunatamente, solo una piccola percentuale di pazienti con HCM sono a rischio di SD, e qualche fattore di rischio maggiore è stato identificato (es. ripetuti episodi sincopali, l'ostruzione all'efflusso

ventricolare , storia familiare positiva per SD, episodi di tachicardia ventricolare sostenuta, ridotta risposta pressoria all'esercizio). Il legame tra SD e grado di ipertrofia ventricolare sinistra rimane controverso. Il background genetico può avere un ruolo significativo, poiché mutazioni della Troponina T (cTnT) sono spesso associate ad un grado lieve di ipertrofia ventricolare ma anche ad un'alta frequenza di casi di SD. La presenza di uno o più fattori di rischio maggiori può giustificare interventi di prevenzione primaria quali l'impianto di un defibrillatore automatico (ICD) in un dato paziente, specie se sono presenti familiarità per SD, sincopi inspiegabili o massiva ipertrofia ventricolare (21). La maggior parte dei pazienti con HCM presenta anomalie all'ECG, che non sono specifiche ma spesso costituiscono una ragione di diagnosi in soggetti asintomatici sottoposti a screening per motivi professionali, sportivi o familiari. Queste alterazioni elettrocardiografiche comprendono segni di ipertrofia e strain ventricolare, profonde onde Q nelle derivazioni inferiori e laterali, inversione dell'onda T diffuse, onde P prolungate, anomalie della conduzione intraventricolare, e prolungamento dell'intervallo QTc (22, 23,24). Il QT lungo congenito o acquisito è un fattore di rischio noto per aritmie maligne. Nei pazienti con HCM , l'intervallo QT è prolungato in più del 10% dei casi (Olivetto I et al ,dati non pubblicati). Tuttavia, le basi molecolari e il reale significato clinico del QT lungo nei pazienti con HCM non è noto. Nello screening familiare delle famiglie positive per HCM, l'ECG appare più sensibile rispetto all'ecocardiografia, in questo dato forse la riprova che il fenotipo elettrico può precedere le manifestazioni morfologiche della malattia (25). La pre-eccitazione ventricolare è un fenomeno poco comune, e può suggerire specifiche origini genetiche come la mutazione della Protein kinase-AMP-activated (26). Peraltro, circa il 6% dei pazienti con evidenze ecocardiografiche di HCM presentano un ECG completamente normale al momento della diagnosi; in questo sottogruppo, la mancanza di anomalie all'ECG si associa con un fenotipo meno severo e una miglior prognosi comparata con il resto della popolazione affetta da HCM (22). La predisposizione dei pazienti ipertrofici alle aritmie è ben nota, e può esprimersi con qualsiasi disturbo del ritmo. La tachicardia ventricolare sostenuta è relativamente rara, ma assume particolare rilevanza prognostica, come più frequente causa di morte improvvisa in questa popolazione (27). Episodi di tachicardia ventricolare sostenuta sono comuni, particolarmente in pazienti adulti ed anziani, e rappresentano un indice di progressione di malattia e di complicanze legate all'insorgenza di insufficienza cardiaca. (28). Infine, bradiaritmie e blocchi di conduzione possono verificarsi nei pazienti con HCM, occasionalmente anche in giovane età, verosimilmente per precoce coinvolgimento del sistema di conduzione nella progressione della malattia. Uno dei principali obiettivi nel trattamento della HCM è il limitare le conseguenze delle aritmie. Il principale ostacolo a questo è la mancata conoscenza dei meccanismi molecolari e cellulari che determinano il substrato pro-aritmico nei pazienti affetti da HCM. Se la presenza di fibrosi tissutale e di disfunzione microvascolare possono rappresentare un substrato per il mantenimento dell'automatismo ventricolare favorendo la formazione di circuiti di rientro, al momento invece non è noto un trigger cellulare per l'innescare delle aritmie nei pazienti

con HCM. Un preciso trigger per le aritmie che conducono a morte improvvisa non è noto, e la strategia che aiuta a trattare i pazienti ad alto rischio prevede l'impianto del defibrillatore (ICD).

A tutt'oggi non stati individuati parametri più robusti che possano discriminare i pazienti HCM che si gioveranno o no dell'impianto dell'ICD. Poiché i pazienti affetti da HCM sono per la maggior parte giovani, occorre considerare che gli effetti negativi a lungo termine dell'ICD (infezioni, discomfort, dolore toracico) superano la prevalenza di interventi appropriati del device. Le complicanze potenziali correlate all'impianto del device si verificano raramente, e comprendono infezioni, ematoma della tasca, pneumotorace e trombosi venosa. Più comunemente, shocks inappropriati si verificano nel 25% dei pazienti con HCM (5.3%/anno) (20, 29, 30), causati da frattura o dislocamento dei cateteri, oversensing, malfunzionamento. Complessivamente, occorre considerare l'evenienza di problematiche psicologiche ed emotive in pazienti giovani a cui venga proposto l'impianto di ICD (31). Appare altrettanto importante considerare l'innegabile beneficio dell'impianto di ICD in pazienti selezionati: in un ampio studio su 506 pazienti con HCM impiantati con ICD (20), interventi appropriati del device (sia defibrillazione/pacing antitachicardia) innescati da FV/TV si sono verificati nel 20% dei pazienti in periodo medio di follow-up di 3 ½ anni . La frequenza di interventi adeguati è stata del'11%/anno nel gruppo di prevenzione secondaria (sopravvissuti all'arresto cardiaco), e del 4%/anno nel gruppo di prevenzione primaria (presenza di fattori di rischio). Tuttavia, per quanto detto finora, l'impianto di ICD non può rappresentare l'unica strategia preventiva per il trattamento delle aritmie in pazienti con HCM. Se venisse identificato uno specifico farmaco antiaritmico efficace in questa popolazione di pazienti, l'impianto dell'ICD potrebbe essere riservato a casi estremi ed accuratamente selezionati. Comunque qualora emergesse la possibilità di impiego di un farmaco antiaritmico presumibilmente efficace sulle aritmie che colpiscono questi pazienti, la sua efficacia potrebbe essere testata in soggetti ad alto rischio già portatori di ICD.

Nonostante i notevoli progressi conoscitivi di tipo genetico e fisiopatologico della cardiomiopatia ipertrofica, l'attuale trattamento farmacologico dei pazienti che ne sono affetti rimane largamente empirico e invariato rispetto alle ultime due decadi. Particolare enfasi nel trattamento della HCM deriva dall'essere una delle cause più comuni di SD nei giovani (32). L'impiego prudente del defibrillatore interno automatico costituisce sicuramente un'opzione per la prevenzione di SD in pazienti ad alto rischio, Tuttavia, il suo utilizzo non è scevro da complicanze (infezioni, shocks inappropriati), e comunque non influenza il substrato patologico (disarray, fibrosi, ipertrofia). Allo stesso modo, procedure quali ablazione settale transcatetere o la miectomia chirurgica, pur efficaci nel ridurre l'ostruzione all'efflusso ventricolare e quindi nel controllo dei sintomi (miglioramento funzionale), non risolvono il problema delle aritmie (33,34,35,36,37). In contrasto, la cicatrice residua all'ablazione settale potenzialmente potrebbe aumentare il rischio di aritmie ventricolari (38,39). L'ipertrofia cardiaca è un importante determinante della disfunzione/insufficienza diastolica, come pure della suscettibilità alle aritmie (7,40). Il trattamento farmacologico attuale della HCM determina un miglioramento sintomatologico, ma non sembra in grado di

prevenire, attenuare o trattare l'ipertrofia cardiaca della HCM (41). I β -bloccanti costituiscono i farmaci di prima scelta, in assenza di controindicazioni, in questa patologia. Il meccanismo d'azione proposto comprende un miglioramento del rilasciamento ventricolare con prolungamento del tempo di riempimento diastolico, nonché riduzione della pressione ventricolare telediastolica ed aumento della perfusione. Inoltre, l'impiego dei β -bloccanti dovrebbe ridurre le aritmie sopraventricolari e ventricolari. Tuttavia, il beneficio di questi farmaci in termini di mortalità e riduzione di SD in pazienti con HCM, nonché il loro impatto nel prevenire e trattare l'ipertrofia rimane da stabilire. Verapamil e diltiazem appaiono efficaci sia per la loro azione inotropa e cronotropa negativa, sia per l'effetto positivo sulla funzione diastolica. Calcioantagonisti della classe delle diidropiridine, come la nifedipina, sono da evitare in questa popolazione di pazienti, perché l'azione vasodilatatrice può indurre ipotensione, sincope ed anche morte. In generale, l'impiego dei calcioantagonisti deve essere prudente per il rischio di ipotensione e sincope, soprattutto nei pazienti che dimostrano un'ostruzione all'efflusso, tanto a riposo quanto durante esercizio (42). La disopiramide, un antiaritmico di classe I, viene usato in associazione ai β -bloccanti per controllare i sintomi correlati all'ostruzione. Gli effetti positivi sono largamente dovuti alla sua azione inotropa negativa, e come per le altre classi di farmaci non sembra influenzare lo sviluppo dell'ipertrofia.

Considerando che le alterazioni del patrimonio calcico intracellulare sono probabilmente le più precoci e importanti nel determinare lo sviluppo dell'ipertrofia e della disfunzione diastolica e tutte le altre anomalie sembrano secondarie a questa, non è stato finora identificato un trattamento mirato sul principale meccanismo patogenetico della HCM. Nessuno dei farmaci citati è specifico per le anomalie del cuore con HCM, e tutti possono avere effetti collaterali che minano la loro efficacia su questi pazienti.

Lo studio propone i risultati sul rimodellamento elettromeccanico miocitario osservati nella cardiomiopatia ipertrofica, e gli effetti dell'applicazione sperimentale della ranolazina, un bloccante della corrente lenta del sodio, su cellule umane provenienti da pazienti affetti da HCM, ipotizzando un impiego clinico del farmaco stesso nell'ambito di questa patologia.

Materiali e Metodi

L'ostruzione del tratto di efflusso del ventricolo sinistro (LVOTO) costituisce un'importante componente fisiopatologica della cardiomiopatia ipertrofica. Quando presente in condizioni di riposo, l'ostruzione nella HCM rappresenta un fattore indipendente di progressione clinica negativa, che trova espressione nell'evoluzione verso l'insufficienza cardiaca e la morte per cause cardiovascolari (17).

Il riscontro di un gradiente sottovalvolare aortico identifica, comunque, un sottogruppo di pazienti nei quali l'intervento di riduzione dello spessore del setto interventricolare, sia attraverso miectomia chirurgica sia con tecniche di ablazione transcateretere, costituisce un'opzione terapeutica. Studi recenti hanno riscontrato una prevalenza di ostruzione del 70% in un'ampia popolazione di pazienti HCM: di questi 37% presentavano ostruzione a riposo, e il rimanente 33% sviluppava un gradiente subaortico $>30\text{mmHg}$ durante esercizio (17). La popolazione studiata presso il Centro di Riferimento Regionale per l'HCM a Firenze presenta una prevalenza di ostruzione molto simile a quella sopracitata, anche se la percentuale dei pazienti con gradiente subaortico è inferiore (12%), poiché la maggior parte dei pazienti con ostruzione viene avviata all'intervento chirurgico di miectomia: più di 75 pazienti sono stati sottoposti ad intervento di miectomia dal gennaio 2004 a Dicembre 2010. Il successo dell'intervento è elevato e le complicanze sono presenti in $< 5\%$ dei pazienti. A parte complicazioni acute perioperatorie, che si sono verificate in un solo paziente, le complicanze correlate all'intervento di miectomia estesa sono principalmente riferibili alla formazione di fistole settali tra rami coronarici e cavità ventricolare, e si sono verificate in 7 pazienti, spontaneamente risolte in 4 su 7; peraltro nessuno dei pazienti ha presentato sequele significative. L'intervento di miectomia estesa ha esitato in netto miglioramento clinico: $>80\%$ dei pazienti sottoposti ad intervento ha migliorato la classe NYHA e la tolleranza alla sforzo. L'outcome a lungo termine di questi pazienti è inoltre condizionato dall'estensione del remodeling miocardico correlato alla HCM e dalla risposta individuale alla malattia. Tuttavia, numerosi studi sottolineano come la miectomia non solo migliori i sintomi e riduca l'ospedalizzazione, ma abbia effetti positivi anche sull'outcome: durante un follow-up di 10aa in > 500 pazienti HCM con sintomi ostruttivi, l'incidenza di morti correlate alla HCM (per morte improvvisa, insufficienza cardiaca o stroke cardioembolico) era del 27% nei non operati rispetto al 5% degli operati (35).

Gli interventi di miectomia estesa vengono condotti in circolazione extracorporea in normotermia. Il chirurgo accede alla cavità ventricolare sinistra per via transaortica, e rimuove una certa quantità di tessuto miocardico dal setto basale. Generalmente la porzione di setto basale rimossa è ricoperta da uno spesso strato fibroso determinato dal contatto tra lembo anteriore mitralico e setto basale. Talvolta, si rende necessario un doppio approccio alla camera ventricolare: transaortico e transapicale, soprattutto dove si riscontri un'importante componente di ostruzione medioventricolare. Qualsiasi sia l'approccio

chirurgico, viene di norma asportata una sufficiente quantità di tessuto vitale per esperimenti in vitro. Lo scopo di questo studio è quello di caratterizzare le proprietà cellulari di cellule vitali di miocardio settale dai campioni intraoperatori, al fine di identificare le proprietà correlate al remodeling da HCM. Per fare questo abbiamo selezionato una popolazione di pazienti sottoposti a miectomia chirurgica, e collezionato i campioni di tessuto miocardico fresco per ottenere cellule isolate.

Un totale di 26 pazienti HCM sottoposti a miectomia, tra novembre 2005 e dicembre 2010, sono stati inclusi nello studio (58% maschi, età media 47 ± 14 aa). Tutti i pazienti erano stati studiati clinicamente prima dell'intervento, mediante accurata raccolta dei dati anamnestici familiari, ECG standard a 12 derivazioni, esame ecocardiografico completo con studio Doppler del flusso transmitralico e del gradiente subaortico e con analisi Tissue Doppler; inoltre tutti i pazienti avevano eseguito una Risonanza Magnetica Cardiaca (CMR) con gadolinium per la valutazione del LGE (late gadolinium enhancement). La valutazione clinica e strumentale dei pazienti era stata eseguita non più di un mese prima dell'intervento.

Il gruppo di controllo ha incluso 8 pazienti di età < 65 aa (età media 58 ± 4 aa, di cui 3 donne), sottoposti a cardiocirurgia per insufficienza aortica. Solo i pazienti senza significativa ipertrofia ventricolare sinistra (spessore settale < 13 mm; spessore medio 11 ± 1 mm), e con normale funzione sistolica del ventricolo sinistro (frazione d'eiezione $> 55\%$; media $61 \pm 4\%$), venivano inclusi nello studio.

Tutti i pazienti nel gruppo HCM mostravano sintomi di ostruzione prima dell'intervento: dispnea da sforzo (77%) e angina (38%) erano quelli più frequenti. 13 pazienti (50%) erano in classe NYHA II, gli altri 13 (50%) erano in classe NYHA III. Inoltre, i pazienti selezionati mostravano un rischio elevato di aritmie ventricolari: 13 pazienti (50%) avevano una storia documentata di tachicardia ventricolare non sostenuta, mentre 14 (53%) avevano avuto episodi di sincopi non vasovagali, ed in 13 soggetti la storia familiare era positiva per morte improvvisa (50%). A causa della presenza di multipli fattori di rischio, a 6 pazienti era stato impiantato un defibrillatore automatico (ICD) come prevenzione primaria. Altri 7 pazienti avevano avuto uno o più episodi di fibrillazione atriale parossistica. Tutti i pazienti erano in terapia medica al momento dell'intervento: 25/26 assumevano β -bloccanti, caposaldo della terapia nelle forme ostruttive della HCM per l'effetto antiaritmico, sul remodeling a lungo termine e sui sintomi ostruttivi; 12 pazienti ricevano disopiramide, che per le sue proprietà inotrope negative riduce l'ostruzione sistolica; in 10 casi l'impiego del diuretico si era reso necessario per ridurre i segni di stasi polmonare determinati dall'ostruzione. Gli ACE-inibitori erano regolarmente assunti da 12 pazienti che mostravano segni di scompenso.

13 soggetti erano stati studiati per l'analisi genetica, e mutazioni in uno o più geni sarcomerici HCM correlati sono state riscontrate in 10 di questi. Si sottolinea che la prevalenza di mutazioni sarcomeriche riscontrate in questa coorte di pazienti è lievemente superiore rispetto a quella della popolazione generale HCM seguita presso il Centro di Cardiomiopatia Ipertrofica di Firenze, dato coerente con un decorso più severo della malattia quando associato a positività genetica (15).

All'esame ecocardiografico preoperatorio, tutti i pazienti presentavano ipertrofia asimmetrica del setto, con un massimo spessore tra 19mm e 33mm (media 26 ± 5 mm). Nella maggioranza dei casi (21/26) il diametro tele-sistolico dell'atrio sinistro era aumentato (media 46 ± 7 mm), come pure il volume. Le dimensioni del ventricolo sinistro erano nei limiti della norma o lievemente ridotte e in nessun caso vi erano segni di disfunzione ventricolare (frazione d'eiezione media valutata alla CMR $73\pm 5\%$). Allo studio Doppler tutti i pazienti presentavano un gradiente a riposo (> 30 mmHg) dovuto all'ostruzione stabile (LVOTO gradiente medio a riposo 73 ± 30 mmHg), rispondendo quindi ai criteri per diagnosi di patologia ostruttiva. 10 soggetti sono stati sottoposti ad eco-stress prima dell'intervento, e questo sottogruppo ha mostrato ridotta tolleranza allo sforzo: la comparsa di angina e/o dispnea durante lo stress era spesso accompagnata da un incremento del gradiente sistolico al tratto di efflusso, a conferma che l'ostruzione è la causa principale dei sintomi in questi pazienti.

L'intera coorte di pazienti mostrava, inoltre, segni ecocardiografici di disfunzione diastolica, il cui grado veniva valutato secondo i criteri standard. Il flusso diastolico transmitralico era alterato in tutti i pazienti: 12 (46%) presentavano "alterato rilasciamento", 13 (59%) avevano un pattern "pseudonormale", e 1 mostrava un quadro "restrittivo". In tutti i soggetti il TDI evidenziava una severa riduzione del movimento diastolico e sistolico del setto basale lungo l'asse base-apice. Quindi, un rallentato e ritardato rilasciamento contribuisce verosimilmente alla genesi dei sintomi nei pazienti ostruttivi.

La risonanza magnetica cardiaca ha consentito un'accurata valutazione del volume ventricolare sinistro e della massa. I valori di massa ventricolare risultavano nettamente aumentati rispetto alla norma, ma non superiori rispetto alla popolazione generale HCM di Firenze, a riprova che i pazienti che sviluppano ostruzione all'efflusso non necessariamente hanno più elevati valori di massa ventricolare rispetto a non ostruttivi. Il LGE (late gadolinium enhancement) consente l'identificazione delle aree fibrotiche all'interno del miocardio ipertrofico, e la presenza e l'estensione di aree LGE si correla con il rischio di un outcome sfavorevole. Ampie aree di fibrosi, specialmente se appaiono come cicatrici transmurali (transmural scar-like), possono alterare la normale conduzione e favorire circuiti di rientro, come pure impedire adeguate fasi di contrazione e rilasciamento ventricolare, facilitando l'evoluzione verso un quadro diastolico restrittivo e di disfunzione sistolica. Nei pazienti studiati era evidente un grado moderato di LGE, e solo un paziente presentava aree estese di fibrosi.

Le caratteristiche demografiche e genetiche di questi soggetti non differiscono molto dalla popolazione generale HCM seguita dal Centro di Firenze, tuttavia la presenza di un elevato rischio aritmico e la severa disfunzione diastolica sembrano più evidenti in questo sottogruppo di pazienti ostruttivi, che si configura quindi come una sottopopolazione con manifestazioni particolarmente severe della cardiomiopatia ipertrofica.

Lo studio delle singole correnti ioniche che contribuiscono alle proprietà elettrofisiologiche del miocardio ha avuto un notevole progresso con lo sviluppo di tecniche che consentono l'isolamento dei singoli miociti. Inoltre la migliore comprensione dell'accoppiamento eccitazione contrazione (Excitation-Contraction Coupling-ECC) è stato possibile grazie alla capacità di isolare cardiomiociti vitali che conservano tutte le proprietà fisiologiche del tessuto intatto. Le metodiche di patch-voltage clamp su cellule intere isolate sono routinariamente impiegate per lo studio della funzione e della modulazione farmacologica dei canali ionici del sarcolemma cardiaco. Inoltre le registrazioni della dinamica intracellulare del calcio con un marcatore sensibile effettuate sul singolo miocita, proveniente da una varietà di modelli sani e malati, forniscono dati vitali sulla fisiologia dell'ECC, come pure sulla patologica alterazione dell'omeostasi del calcio intracellulare che determina deterioramento della meccanica ventricolare e un aumentato rischio di aritmie in cuori malati. Le informazioni provenienti da questi studi di base hanno un'importanza critica per la comprensione degli effetti elettrofisiologici e meccanici dei farmaci impiegati in clinica. Tuttavia, i risultati ottenuti da modelli animali non sembra siano estrapolabili su modelli di miociti umani. In questo senso le uniche possibilità offerte per lo studio di miociti umani derivavano dallo studio di cellule provenienti da cuori terminali, che necessitano di trapianto. La cardiomiopatia ipertrofica, è caratterizzata da ipertrofia cardiaca, alto rischio aritmico, anomalie della contrazione dovute all'ostruzione del tratto di efflusso e disfunzione diastolica. I cardiomiociti nei cuori con HCM sono soggetti a un complesso processo di rimodellamento che comprende variazioni della struttura cellulare (ipertrofia, disarray miofibrillare) e dell'ECC. Tuttavia la maggior parte delle informazioni sulla disfunzione miocitaria derivano da esperimenti su animali transgenici, poiché solo una minoranza di pazienti HCM evolve verso uno stadio di end-stage failure e successivo trapianto cardiaco. Quindi la possibilità di isolare cellule da cuori HCM è veramente rara con metodiche standard. Almeno il 30% dei pazienti HCM sviluppa sintomi da ostruzione all'efflusso e l'unica vera opzione terapeutica per la risoluzione dell'ostruzione è l'intervento di miectomia: durante la procedura porzioni variabili di tessuto del setto basale sono escisse per via transaortica. Questi porzioni di tessuto miocardico ipertrofico sono quindi disponibili per l'isolamento di cellule da tessuto fresco. In questo lavoro uno degli obiettivi è stato quello di sfruttare la possibilità di avere un numero sufficiente di miociti isolati dal setto ipertrofico, adattando le tecniche tradizionali, al fine di utilizzarli per lo studio delle caratteristiche elettrofisiologiche e di accoppiamento eccitazione-contrazione.

Il tessuto miocardico prelevato in sala operatoria è stato immediatamente conservato in soluzione cardioplegica (in mmol/L: KH_2PO_4 50; MgSO_4 8; HEPES 10; adenosina 5; Glucosio 140; mannitolo 100; taurina 10; pH 7,4 con KOH). Una piccola porzione di tessuto veniva congelata in azoto liquido ed impiegato per l'isolamento del mRNA. Le trabecole endocardiche utilizzabili per le misure meccaniche erano sezionate e preparate per i test. Entro 10 minuti dal prelievo, veniva iniziato il processo per isolare le cellule dal campione: dopo rimozione dello strato fibroso endocardico, spesso presente a livello del setto basale, veniva iniziato il processo di digestione enzimatica. Al termine di questa procedura solo i miociti

che apparivano al microscopio di forma allungata con chiare striature e senza significative inclusioni erano considerati vitali e potevano essere impiegati per i test sperimentali (Fig.1)

Per lo studio sui miociti isolati sono state impiegate tecniche di “perforated patch whole-cell voltage-clamp o current-clamp” per misurare rispettivamente le correnti di Ca^{2+} o i potenziali di membrana. Le variazioni di Ca^{2+} intracellulare sono state simultaneamente monitorizzate con l’uso di tracciante fluorescente, Fluoforte (Enzo Life Sciences, Famingdale, NY, USA). Tecniche di “ruptured-patch voltage-clamp” sono state impiegate per la registrazione delle correnti del potassio transient outward (I_{to}) e inward rectifier (I_{K1}), delle correnti tardive del sodio (I_{NaL}) e per quantificare il contenuto in calcio del Reticolo Sarcoplasmatico (SR). Per ogni misura di corrente sono state impiegate specifiche soluzioni e protocolli.

I segnali dei potenziali e delle correnti erano misurati con un amplificatore Multiclamp 700B (Molecular Devices, Inc), ed erano filtrati a 2KHz e digitalizzati attraverso un convertitore A/D12-bit (Digidata 1440A, Sampling rate 5KHz; Molecular Devices, Inc). L’acquisizione e l’analisi erano controllate da un software dedicato (pClamp10.0; Molecular Devices, Inc).

Le dimensioni delle trabecole erano le seguenti: lunghezza 4-5mm; larghezza 0.9-1.7mm e spessore 0.7-1.2mm, ed erano montate tra un trasduttore di forza (KG7A Scientific Instruments, Heidelberg, Germany) e un motore (Aurora Scientific Inc., Aurora, Canada), entrambe connessi ad un micromanipolatore. Le trabecole inizialmente erano perfuse con una soluzione a basso contenuto di calcio (Krabs-Henseleit buffer con BDM) a temperatura ambiente e stimulate a 0.2Hz. Successivamente la soluzione veniva sostituita con una simile a concentrazioni di calcio progressivamente crescenti fino a 2mmoli/L, mentre la temperatura della soluzione veniva aumentata a 35.5°C. I campioni venivano fatti stabilizzare per 20-30min prima di iniziare l’esperimento.

Le determinazioni della forza isometrica venivano registrate in diverse condizioni sperimentali e protocolli di stimolazione. In breve, venivano valutate le risposte inotrope all’aumentare della frequenza di stimolazione [relazione forza-frequenza: stimolazioni a frequenze crescenti (0.1-2.5Hz) a 35°C]; per ogni frequenza, la forza veniva misurata dopo aver raggiunto lo steady-state, durante pause post-stimolazione e dopo stimolazione con agonisti β -adrenergici, e le cinetiche di contrazione isometrica venivano valutate in ogni condizione sperimentale.

Per i test tanto sui cardiomiociti isolati quanto sulle trabecole, la ranolazina era usata alla concentrazione di 10 μ M. Le registrazioni dei test in presenza del farmaco venivano eseguite dopo >3minuti dall’esposizione. A seguire, il farmaco veniva lavato per >5minuti e le misure erano ripetute in assenza di ranolazina.

I dati clinici sono espressi come media \pm SD. I dati ottenuti dalle cellule e dalle trabecole vengono riferiti come media \pm SEM. Il Paired t-test è stato usato per confrontare misure ripetute, altrimenti è stato impiegato l’ unpaired -t-test. Il Pearson’s Chi-square test è stato utilizzato per variabili non numeriche. Valori di $p < 0.05$ sono considerati statisticamente significativi.

Risultati

Potenziali d'azione in cardiomiociti umani HCM. Un totale di 78 cellule isolate dai campioni di miectomia da 26 pazienti HCM (Fig.1a-c), e 22 cellule da campioni settali di 8 pazienti del gruppo di controllo, sono state studiate usando la tecnica del patch-clamp. In accordo al maggiore volume cellulare (Fig.1.d-e) la capacità di membrana – un indice elettrofisiologico della superficie cellulare- era marcatamente aumentato nei cardiomiociti HCM (177.8 ± 6.2 pF in HCM vs 111 ± 5.9 pF nei miociti di controllo, $p < 0.01$). Tuttavia il rapporto capacità /volume era ridotto nei cardiomiociti HCM (5.8 ± 0.35 F/L in HCM vs 6.42 ± 0.42 F/L nei controlli, $p < 0.05$), suggerendo un pronunciato riarrangiamento delle strutture sarcolemmatiche (es t-tubuli) associato all'ipertrofia cellulare.

I risultati del patch-clamp test mostravano che la durata del potenziale d'azione (APD) registrato a varie frequenze di stimolazione (0.2-0.5-1Hz) era marcatamente prolungata nei miociti provenienti dai pazienti con HCM, paragonata ai controlli. L'APD al 90% della ripolarizzazione (APD90%) a 0.2Hz era 916 ± 89 ms in HCM e 507 ± 61 ms nei miociti di controllo ($p < 0.01$) (Fig 2a); a 1Hz , l'APD90% era 501 ± 27 ms e 361 ± 42 ms, rispettivamente ($p < 0.01$). Da notare che i valori di APD riscontrati nei controlli erano sovrapponibili a quelli riportati da miociti isolati da donatori di cuore sani .

I cardiomiociti HCM mostravano un'ampia distribuzione dei valori di APD paragonati ai controlli (Fig.2.b). Sebbene una frazione di miociti HCM presentasse potenziali d'azione di normale durata, la maggior parte di questi (61%) aveva APDs che superavano il limite superiore dei controlli (570ms), e il 27% aveva APDs > 1000ms.

La differenza nei valori di APD tra campioni HCM e controlli rimaneva significativa anche comparando la media degli APDs, ottenuta dalla media dei singoli APDs misurati su cardiomiociti di un singolo paziente, e usando N come numero di pazienti (media APD90% a 0.2Hz: 887 ± 63 ms in 26 pazienti HCM e 448 ± 31 ms in 7 pazienti controllo, $p < 0.01$). La variabilità inter-individuale dell'APD medio tra i pazienti era maggiore nei casi HCM rispetto ai pazienti controllo (Fig. 2.c). In particolare, l'APD medio da 13 pazienti HCM con storia di tachicardia ventricolare non sostenuta (NSVT) alla registrazione Holter era maggiore rispetto a 13 pazienti senza NSVT (APD90% medio: 1104 ± 88 ms vs 670 ± 42 ms, rispettivamente; $p < 0.01$) (Fig.2c). Questa osservazione suggerisce che il prolungamento del potenziale d'azione a livello settale sia associato ad un aumentato rischio di sviluppare aritmie ventricolari (da notare che tutti 6 i pazienti a cui era stato impiantato un ICD erano nel gruppo a più lungo AP). Peraltro, non sono state riscontrate differenze dell'intervallo QTc tra due gruppi, a conferma di uno scarso valore predittivo del QTc nella HCM. Nonostante queste alterazioni, gli APDs dei cardiomiociti HCM si riducevano all'aumentare della frequenza

di stimolazione (Fig.2.d), sottolineando una conservata fisiologica frequenza-dipendenza dell'APD nella cardiomiopatia ipertrofica.

In accordo con precedenti esperimenti, la stimolazione dei recettori β -adrenergici con Isoproterenolo 10^{-7} M accorciava leggermente l'APD nei miociti di controllo (ADP90%: $-20 \pm 4\%$) (Fig. 2.e). Un effetto opposto veniva registrato sui miociti HCM dove l'applicazione di isoproterenolo 10^{-7} M causava un prolungamento dell'APD (ADP90%: $+26 \pm 8\%$ a 0.2Hz).

Poiché il prolungamento dei potenziali d'azione aumenta il rischio di depolarizzazioni precoci (EADs), veniva registrata l'insorgenza di EADs durante la fase di plateau del potenziale d'azione (Fig.2.f). Nei cardiomiociti HCM, la frequenza di EAD era 6 volte maggiore rispetto a i controlli (55.5% vs 8,3%, rispettivamente; $p < 0.01$) (Fig.2.g). Inoltre, i miociti HCM dimostravano un'aumentata frequenza di post-depolarizzazioni tardive (DADs), registrate come eventi spontanei durante la fase diastolica, e di raro riscontro nei miociti di controllo.

Basi ioniche dell'APD prolungato nella HCM. La durata del potenziale d'azione dipende dall'equilibrio tra correnti transmembrana in ingresso e in uscita (inward e outward currents), in ogni specifico momento del ciclo cardiaco. La corrente ripolarizzante del potassio in uscita (outward) è cruciale nel determinare la durata della fase di plateau e della fase finale di ripolarizzazione del potenziale d'azione. Rispetto alle correnti ripolarizzanti del K^+ , i cardiomiociti HCM mostravano una significativa riduzione della corrente I_{to} (transient outward current) a tutti i livelli di potenziale di membrana (a +40mV: 0.71 ± 0.54 pA/pF in HCM e 5.22 ± 0.40 pA/pF nei controlli; $p < 0.01$) (Fig.3a,3b). I_{k1} (Inward rectifier K current), essenziale per la ripolarizzazione terminale rapida e il mantenimento di un potenziale di riposo stabile nei miociti ventricolari, era pure ridotta nei campioni HCM (a -90mV: -3.82 ± 0.63 pA/pF in HCM e -5.55 ± 0.77 pA/pF nei controlli; $p < 0.01$). Questi dati elettrofisiologici erano associati a una generale riduzione dell'espressione genica codificante per le subunità dei canali del K^+ , comprese le subunità K_{to} e I_{k1} . Per la corrente I_k (Delayed Rectifier K current), determinante nella durata del plateau e del potenziale d'azione, lo studio trascrizionale delle sue componenti principali I_{kr} e I_{ks} , ha mostrato una riduzione della loro espressione genica, contribuendo probabilmente alla riduzione complessiva di questa corrente (I_k). In accordo a questo risultato, l'alterazione della I_k era prevedibile si potesse verificare nei campioni HCM: la riduzione della I_k può contribuire in modo significativo al prolungamento del potenziale d'azione.

L'analisi delle correnti L-type Ca^{2+} ha mostrato che, rispetto ai controlli, la densità di I_{Ca-L} era significativamente aumentata nei cardiomiociti HCM a tutti i voltaggi (a 0mV: I_{Ca-L} 6.48 ± 0.25 pA/pF nei miociti HCM vs 5.22 ± 0.40 pA/pF nei controlli; $p < 0.05$) (Fig. 3c, 3d). Tuttavia, l'attivazione e l'inattivazione della corrente I_{Ca-L} voltaggio-dipendente era simile a quella osservata nei miociti di controllo. Da notare che l'espressione del gene codificante per il canale I_{Ca-L} (CACNA1.2) era aumentata (Fig.3,e) nel miocardio HCM, suggerendo una base trascrizionale per il potenziamento della corrente I_{Ca-L} . Inoltre, la cinetica di

inattivazione della I_{Ca-L} era più lenta nei cardiomiociti HCM (la costante di tempo per l'inattivazione lenta essendo di 112.3 ± 8.3 ms in HCM e 92.3 ± 5.4 ms nei miociti di controllo; $p < 0.05$).

La corrente del Na^+ era evocata da step di depolarizzazione da -120 mV a -20 mV e la componente tardiva (I_{NaL}) calcolata come integrale della corrente all'interno tra 50 e 750 ms dall'inizio di ogni step (Fig. 3, f). L'ampiezza della I_{NaL} nei cardiomiociti HCM (195 ± 27 A*ms*F⁻¹) era maggiore rispetto a misure preliminari eseguite su 5 cardiomiociti di un singolo paziente di controllo (74 ± 27 A*ms*F⁻¹) ($p < 0.05$) (Fig. 3g) e ai valori riportati da miociti ottenuti da donatori sani (17). Quindi, l'aumento della I_{NaL} può avere un ruolo primario nel determinare un prolungamento del potenziale d'azione nei miociti HCM.

Anomalie nell'accoppiamento eccitazione –contrazione. Per valutare se il prolungamento del potenziale d'azione e le alterate correnti ioniche possano interferire con l'accoppiamento-eccitazione-contrazione nei miociti HCM, sono stati misurati i movimenti del Ca^{2+} intracellulare usando un marcatore sensibile al calcio, il Fluoforte (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA).

L'ampiezza dei transienti del Ca^{2+} evocate durante test di current –clamp era simile o leggermente aumentata nei cardiomiociti HCM rispetto ai controlli sia a 1 Hz ($0.22 \pm 0.01 F/F_{max}$ vs $0.24 \pm 0.01 F/F_{max}$, rispettivamente ; $p = 0.11$) sia a 0.2 Hz ($0.29 \pm 0.01 F/F_{max}$ vs $0.25 \pm 0.01 F/F_{max}$, rispettivamente; $p < 0.05$) (Fig. 4a, 4c). I cardiomiociti HCM mostravano un marcato aumento della concentrazione intracellulare diastolica di Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) per tutte le frequenze di stimolazione (Fig. 4b, 4e). L'aumento frequenza-dipendente del ($[Ca^{2+}]_i$) era maggiore nei miociti HCM che nei controlli (Fig 4b, 4e). La cinetica del transiente del Ca^{2+} , come indicato dal tempo di picco e dal tempo di decadimento, era significativamente più lunga nei cardiomiociti HCM che nei controlli (Fig. 4d, 4e). Il fisiologico adattamento alla frequenza del Ca^{2+} era mantenuta nei miociti HCM (fig 4d).

Il prolungamento del potenziale d'azione può di per sé rendere conto di anomalie della cinetica del Ca^{2+} . Per escludere il contributo di un anomalo APD, le misure del transiente calcico sono state eseguite fuori dalla modalità di voltage-clamp per verificare la durata della depolarizzazione. (Fig. 5a-b). In questo modo, il transiente calcico, evocato da depolarizzazioni pulsate di durata fissa, mostrava sempre una più lenta ascesa e un più lento decadimento nei miociti HCM rispetto ai controlli, suggerendo che altre componenti dell'accoppiamento eccitazione-contrazione (ECC), accanto al prolungamento dell' APD (es la funzione del reticolo sarcoplasmatico) possano influire nel determinare un anomalo transiente del Ca^{2+} . Per questa ragione, è stato esaminato il livello di espressione genica delle quattro proteine fondamentali coinvolte nella regolazione dell'omeostasi del Ca^{2+} . Parallelamente alle anomalie funzionali, l'espressione della Ca^{2+} -ATPase del reticolo sarcoplasmatico (SERCA2 gene) era ridotta del 40% nei campioni HCM vs i controlli ($p < 0.05$), mentre i livelli di espressione genica per il fosfolambano erano inalterati (Fig. 5c). D'altra parte, l'espressione per lo scambiatore Na^+/Ca^{2+} (NCX gene) e per il recettore della rianodina (RyR2) erano aumentati del 65% e del 52%, rispettivamente ($p < 0.05$) nei campioni HCM rispetto ai controlli (Fig. 5c).

Infine, è stato indagato se il carico di calcio del SR fosse alterato nei miociti HCM rispetto ai controlli, usando il metodo della caffeina per quantificare il Ca^{2+} totale del SR (Fig. 6.a). Il carico calcico del SR era moderatamente ma significativamente aumentato nei miociti HCM ($107 \pm 9 \text{ mmol/L}$) vs i controlli ($90 \pm 6 \text{ mmol/L}$) ($p < 0.05$) (Fig. 6.c). Nonostante la sovraespressione del NCX1, era registrata una riduzione della velocità di estrusione del Ca^{2+} attraverso lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, stimata attraverso il più lento decadimento (-19%) del transiente del Ca^{2+}_i caffeina-indotto in miociti HCM (Fig. 6b,d).

Effetti della Ranolazina sul APD e sul transiente del calcio intracellulare. Quindi si è studiato l'effetto della ranolazina, inibitore della corrente tardiva del sodio (I_{NaL}), sulle principali alterazioni riscontrate nei cardiomiociti HCM: prolungato APD e anomalie del transiente del Ca^{2+} . Nei cardiomiociti di controllo la ranolazina ($10 \mu\text{M}$) non modificava sostanzialmente l'APD. (Fig. 7a). Per esempio l'APD_{90%} a 0.2 Hz era di $515 \pm 61 \text{ ms}$ in assenza vs $477 \pm 64 \text{ ms}$ in presenza di ranolazina ($p = 0.67$). In modo simile, gli effetti della ranolazina sull'ampiezza e cinetica del transiente del Ca^{2+}_i erano trascurabili nei miociti di controllo.

Al contrario, la ranolazina riduceva significativamente l'APD nei miociti HCM (Fig. 7b); a 0.2 Hz, APD_{90%} era $946 \pm 95 \text{ ms}$ in assenza vs $707 \pm 71 \text{ ms}$ in presenza di ranolazina ($p < 0.01$). Simili risultati si osservavano a più alte frequenze di stimolazione. Inoltre, la frequenza di EADs nei cardiomiociti HCM era dimezzata con l'applicazione della ranolazina (Fig. 7e).

Parallelamente alla ridotta durata dell'APDs con la ranolazina, veniva registrato un accelerato tempo di salita e di decadimento del transiente del Ca^{2+} nei cardiomiociti HCM ($-16 \pm 3\%$ tempo di picco e $-21.2 \pm 2\%$ tempo di decadimento a 0.2 e 1 Hz) (Fig. 7b,7d). Anche l'ampiezza del transiente del Ca^{2+} era ridotta dopo applicazione di ranolazina ($-30 \pm 4\%$ a 0.2 Hz, $-21 \pm 4\%$ a 1 Hz). Negli esperimenti in voltage-clamp, dopo depolarizzazione a -20 mV, la ranolazina a $10 \mu\text{M}$ selettivamente riduceva la corrente I_{NaL} del $72 \pm 8\%$ nei miociti HCM (Fig. 7f), suggerendo che l'effetto descritto del farmaco è consistente con una specifica inibizione della corrente tardiva del Na^+ (I_{NaL}). Tutti gli effetti della ranolazina erano annullati dopo 5 minuti di lavaggio del preparato.

Effetti della ranolazina sul $[\text{Ca}^{2+}]_i$ diastolico e sul carico del RS. La ranolazina riduceva significativamente il calcio diastolico intracellulare $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nei cardiomiociti HCM ($-14 \pm 2\%$ a 0.2 Hz, $-20 \pm 2\%$ a 1 Hz) (Fig. 7b), e attenuava l'aumento del calcio diastolico $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dopo incremento delle frequenze di stimolazione (Fig. 8a-b): quando la frequenza di stimolazione veniva aumentata da 0.2 Hz a 1 Hz il carico diastolico di $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aumentava del $+15 \pm 2\%$ senza farmaco e del solo $+6 \pm 2\%$ in presenza di ranolazina ($p < 0.01$). Questi effetti erano reversibili dopo washout del farmaco dal preparato.

Per meglio comprendere il meccanismo all'origine degli effetti della ranolazina, sono state misurate le variazioni del transiente del Ca^{2+} evocate da brevi depolarizzazioni pulsate di durata costante in voltage-clamp sui miociti HCM. In queste condizioni, gli effetti della ranolazina ($10 \mu\text{M}$) erano più lievi ma ancora evidenti tanto sulla cinetica del transiente del Ca^{2+} , quanto sul carico diastolico di calcio. (Fig. 8c),

suggerendo che i benefici effetti sull'inibizione della corrente tardiva del Na^+ (I_{NaL}) sul Ca^{2+} handling non sono solo conseguenza dell'accorciamento dell'APD.

La ranolazina riduceva il carico di Ca^{2+} del RS del $11 \pm 2\%$ nei miociti HCM (Fig.8C), ed il farmaco accelerava il decadimento del transiente del Ca^{2+} caffeina –indotto, forse per un'aumentata estrusione del Ca^{2+} attraverso lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ dopo esposizione al farmaco (Fig.8c). In accordo con la riduzione del Ca^{2+} diastolico e del carico di Ca^{2+} del RS, la ranolazina riduceva significativamente anche la frequenza di DAD nei miociti HCM . Nei cardiomiociti di controllo l'applicazione della ranolazina non influiva in modo significativo sul Ca^{2+} diastolico ne sulla cinetica del transiente del Ca^{2+} stimolato in esperimenti in voltage-clamp.

Effetti della ranolazina sulla contrazione miocardica. Infine sono stati studiati gli effetti della ranolazina sulla funzione contrattile miocardica di trabecole ventricolari intatte sezionate dai campioni di miectomia (Fig.9). La ranolazina a $10\mu\text{M}$ su trabecole intatte di HCM accelerava la cinetica di sviluppo della forza (tempo di picco a 1Hz : $215 \pm 12\text{ms}$ in assenza di ranolazina vs $191 \pm 9\text{ms}$ in presenza ; $p < 0.01$) e accorciava la durata totale della contrazione. (Fig. 9b-d). Sebbene la tensione passiva diastolica a basse frequenze di stimolazione ($< 0.5\text{Hz}$) era simile in presenza o in assenza del farmaco (a 0.5Hz : 4.29 ± 0.94 vs $4.35 \pm 0.92\text{mN/mm}^2$; $p = 0.47$), la ranolazina riduceva significativamente l'aumento di tensione diastolica all'aumentare della frequenza di stimolazione (aumento medio di tensione diastolica da 0.5Hz a 3Hz era $3.64 \pm 0.29\text{mN/mm}^2$ in assenza vs $2.37 \pm 0.43\text{mN/mm}^2$ in presenza di ranolazina : $p < 0.05$) (Fig.9c); il farmaco tendeva a ridurre il picco di forza isometrica (attiva)(Fig .9e), tuttavia il farmaco non influiva sulla relazione forza-frequenza dei miociti HCM (Fig.9f). Sulle trabecole dei pazienti controllo, l'inibizione della I_{NaL} da parte della ranolazina non esitava in significativi effetti sulla cinetica e ampiezza della forza di contrazione né sulla tensione diastolica. Gli effetti osservati del farmaco sulla forza sono consistenti con i cambiamenti del Ca^{2+} handling descritti nelle cellule HCM isolate.

Discussione

Studi recenti hanno indagato il ruolo di alterazioni delle corrente lenta del Na^+ (I_{NaL}) in differenti malattie cardiache. E' noto che i canali voltaggio-dipendenti del Na^+ nel miocardio consentono una veloce propagazione dell'impulso e l'inizio del potenziale d'azione grazie ad una ampia ma breve corrente all'interno, ma è stato anche rilevato che una piccola frazione di corrente del Na^+ persiste durante la fase di plateau del potenziale d'azione ('late ' o 'persistent' Na^+ current). L'esistenza di questa corrente tardiva del Na^+ , ha stimolato un serie di studi in differenti modelli di malattia cardiovascolare che hanno evidenziato come un potenziamento di questa corrente possa essere alla base di diverse patologie cardiache acquisite e contribuire alla loro patogenesi; sebbene questa piccola corrente si riscontri nei miociti normali, anomale correnti lente del Na^+ sono state trovate in cellule estratte da cuori di pazienti affetti da insufficienza cardiaca terminale e in modelli animali di cuori insufficienti o rimodellati dopo infarto (43). I canali ionici sia per la componente rapida che per quella più lenta della corrente del Na^+ sono gli stessi (Na V1.5); quindi, piuttosto che l'espressione di differenti isoforme dei canali del Na^+ , malattie acquisite possono alterare la struttura dei canali stessi (44). Ipossia, radicali liberi dell'ossigeno, ischemia ed ossido nitrico in condizioni sperimentali potenziano la corrente tardiva del Na^+ (45), e qualsiasi sia la causa di questo potenziamento, il fenomeno si associa ad un marcato aumento della durata del potenziale d'azione e della sua variabilità; ne consegue una ridotta riserva ripolarizzante che a sua volta incrementa l'incidenza delle depolarizzazioni precoci e l'innestarsi di aritmie.

Inoltre l'aumento del flusso all'interno del Na^+ non solo determina conseguenze elettrofisiologiche, ma può direttamente alterare l'omeostasi intracellulare del calcio. Sebbene l'ampiezza della corrente I_{NaL} sia solo 1/30 del picco di corrente I_{Na} , è tuttavia prolungata (15-20 volte la durata del picco), e questo provoca un aumento di Na^+ intracellulare pari a circa il 50% per ogni battito (46). La concentrazione intracellulare di Na^+ regola direttamente la funzione dello scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) del sarcolemma, principale responsabile del mantenimento del bilancio calcico intracellulare. L'aumento della $[\text{Na}^+]_i$ riduce la funzione dello scambiatore NCX durante la diastole causando un'insufficiente estrusione del Ca^{2+} ; al contrario durante la sistole l'attività inversa del NCX trattiene Ca^{2+} all'interno della cellula contribuendo all'overload cellulare di Ca^{2+} (47). Il sovraccarico di calcio ha diversi effetti sulla funzione miocardica: il reticolo sarcoplasmatico sovraccarico di Ca^{2+} aumenta la probabilità di rilascio spontaneo di calcio attraverso i recettori per la ryanodina (RyR) durante la diastole, con possibile induzione di depolarizzazioni tardive aritmogene; l'aumento del calcio citosolico può ridurre la funzione delle correnti Ca^{2+} dipendenti ripolarizzanti del K^+ , contribuendo al prolungamento del potenziale d'azione (AP). Inoltre, il cronico sovraccarico di Ca^{2+} può causare l'attivazione di numerose vie enzimatiche intracellulari (PKC, CaMKII e calcineurina) che non solo alterano acutamente l'omeostasi del calcio stesso e le correnti di membrana ma possono anche attivare

fattori trascrizionali che infine determinano una risposta ipertrofica. Il concomitante aumento intracellulare del Na^+ e del Ca^{2+} altera inoltre le funzioni mitocondriali con anomala produzione di ATP: dato il maggior consumo di ATP causato dall'iperattività della Na^+-K^+ ATPase (per eliminare il Na^+ in eccesso) e della pompa SERCA (per immagazzinare l'eccesso di Ca^{2+}), il cronico aumento della I_{NaL} determina una significativa disfunzione metabolica.

L'alterata distribuzione del Ca^{2+} intracellulare, mantenendo elevato il catione Ca^{2+} intracellulare durante la diastole è di cruciale importanza nel determinare l'alterato rilasciamento nella HCM. Il potenziamento della I_{NaL} può contribuire in modo significativo a questa disfunzione diastolica, attraverso differenti meccanismi: 1) il prolungamento del APD determina un rilascio prolungato di Ca^{2+} e prolunga la contrazione: la non omogeneità del prolungato APD può a sua volta causare inhomogeneo rilasciamento; 2) l'aumento del Ca^{2+} diastolico rallenta e rende incompleta l'inattivazione dei miofilamenti e il rilasciamento: questo fenomeno è più evidente alle alte frequenze di stimolazione, per il maggior carico di Na^+ e Ca^{2+} citosolico; 3) Il rilascio spontaneo dal SR del Ca^{2+} da sovraccarico può generare contrazioni diastoliche che alterano il rilassamento (48). In conclusione, l'aumento della corrente tardiva del sodio non solo altera la funzione di membrana ma sembra avere molteplici conseguenze sulla distribuzione e sul metabolismo del calcio, potendo quindi contribuire significativamente alla patogenesi della cardiomiopatia ipertrofica. In linea con questo fenomeno, un bloccante selettivo della corrente lenta del Na^+ potrebbe rappresentare una specifica e relativamente sicura opzione terapeutica per il trattamento della disfunzione diastolica e delle aritmie Ca^{2+} correlate, entrambe presenti nella HCM.

La ranolazina, nasce come inibitore dell'ossidazione degli acidi grassi e possibile farmaco antianginoso (49); questo effetto modulatore della ranolazina era considerato protettivo sul tessuto miocardico soggetto a danno da ischemia-riperfusion. L'efficacia della ranolazina come farmaco antianginoso è stata riportata in due trials clinici in pazienti affetti da angina cronica stabile (50,51). Gli effetti elettrofisiologici della ranolazina sono stati scoperti nel 2004 (52): il farmaco determina una potente inibizione della I_{NaL} , con minimi o nulli effetti sul picco di corrente del Na^+ , nel range di concentrazione terapeutica. In un ampio trial clinico su pazienti con NSTEMI (53), la ranolazina riduce in modo significativo l'incidenza di tachicardia ventricolare e di aritmie atriale dopo il primo evento; in tutti i modelli di ischemia miocardica la ranolazina abbassa la vulnerabilità alle aritmie ventricolari. L'effetto antiaritmico del farmaco sembra essenzialmente dovuto al blocco della I_{NaL} (54), ma è importante sottolineare la mancanza di effetto sul miocardio sano, che rende la molecola molto sicura.

Il blocco della I_{NaL} , per effetto della ranolazina, contribuisce alla riduzione del sovraccarico di Ca^{2+} secondario all'aumento del Na^+ intracellulare, ma previene efficacemente il rilascio spontaneo di calcio registrato in modelli di miociti da cuori scompensati. (55; 56). Inoltre come già descritto, controbilanciando gli effetti indiretti dell'aumento di I_{NaL} sulla distribuzione del Ca^{2+} , la ranolazina potrebbe essere in grado di ridurre sia la durata della contrazione che la tensione diastolica ed accelerare il rilasciamento (57).

Concordemente, il farmaco ha dimostrato di poter aumentare la cinetica parietale e velocizzare il riempimento diastolico su cuori ischemici senza interferire sull'accorciamento sistolico (58); risultati simili sono stati ottenuti su campioni di cuori di pazienti end-stage: il farmaco riduceva la tensione diastolica ad alte frequenze di stimolazione senza ridurre la forza di contrazione. Quindi la ranolazina sembrerebbe ridurre il calcio diastolico senza interferire sul rilascio di calcio sistolico: su modelli di cuori insufficienti, questa molecola sembra migliorare la contrazione sistolica perché il ridotto rilascio dal SR potrebbe preservare l'integrità delle riserve nonostante una globale riduzione del contenuto di Ca^{2+} cellulare (59). Attualmente non esistono evidenze di un ruolo della ranolazina nella cardiomiopatia ipertrofica, sia nel migliorare la funzione diastolica, sia nel prevenire disturbi aritmici.

Nella maggioranza dei pazienti affetti da cardiomiopatia ipertrofica, la causa molecolare primaria delle manifestazioni fenotipiche e cliniche è rappresentata da una mutazione genica di una delle proteine del sarcomero, che determina un'anomala funzione dei miofilamenti (15). In risposta a questa alterazione primaria, il cuore rimodella al fine di mantenere un'adeguata portata cardiaca; tuttavia il remodeling cardiaco può diventare negativo e causare disfunzione contrattile e aritmie (60). Il processo che lega le alterazioni geniche dei miofilamenti al fenotipo della HCM rimane ampiamente sconosciuto, sebbene sia verosimile il coinvolgimento di complesse anomalie del profilo elettrofisiologico cellulare nonché meccanismi dell'omeostasi del calcio.

Questo studio ha analizzato le variazioni a livello cellulare che si verificano nei miociti di cuori umani affetti da cardiomiopatia ipertrofica. È stato riscontrato che il profilo funzionale dei cardiomiociti di pazienti HCM differisce marcatamente da quello dei soggetti di controllo, per diversi aspetti, che comprendono: il prolungamento dell'AP, la ridotta densità di corrente del K^+ , l'aumentata densità di corrente I_{NaL} e $\text{I}_{\text{Ca-L}}$, la rallentata cinetica del transiente del Ca^{2+} e, ad alte frequenze di stimolazione, un'anomala ampiezza del transiente del Ca^{2+} ed un aumento del livello di Ca^{2+} diastolico. È stato quindi testato l'impiego della ranolazina, inibitore specifico della I_{NaL} : l'impiego del farmaco ha corretto diversi aspetti del rimodellamento elettrofisiologico e del Ca^{2+} handling intracellulare, osservati nei cardiomiociti HCM. I dati ottenuti, consentono di ipotizzare un uso terapeutico di un inibitore selettivo della I_{NaL} , potenzialmente capace di intervenire su alcune manifestazioni cliniche della HCM, come le tachiaritmie ventricolari e la disfunzione diastolica (85), fornendo anche una base razionale per studi clinici che valutino l'efficacia della ranolazina in questa malattia.

Conseguenze fisiopatologiche del rimodellamento elettrofisiologico nei cardiomiociti HCM. La principale alterazione funzionale osservata nei cardiomiociti umani HCM è costituita dal marcato prolungamento della durata del potenziale d'azione (APD) e l'aumentata frequenza post-depolarizzazioni precoci (EADs)(Fig.2). Un prolungato AP può contribuire ad aumentare il rischio aritmico nella HCM, poiché aumenta la possibilità di sviluppare EADs, che possono innescare aritmie sostenute: le EADs erano frequenti nei miociti HCM durante registrazioni prolungate, maggiormente nelle cellule con più lunghi AP. Inoltre, la durata dell'AP

tendeva ad aumentare quando le cellule venivano stimulate con isoproterenolo, suggerendo un aumento del rischio di aritmie in condizioni di stress. Il riscontro di un aumentato rischio aritmico a livello cellulare è stato associato al parallelo rischio riscontrato nei pazienti: infatti i miociti provenienti da pazienti con storia positiva per aritmia ventricolare non sostenuta presentavano un APD medio più lungo rispetto alle cellule di pazienti senza storia aritmica. La durata del potenziale d'azione non si correlava né allo spessore massimo di parete né all'intervallo QTc dell'ECG di superficie.

Diversi meccanismi possono essere implicati nel prolungamento dell'AP nella HCM. In parte, questo fenomeno appare secondario alla selettiva riduzione delle correnti del K^+ determinata a livello trascrizionale, come suggerito dalla down-regulation del mRNA per i canali del K^+ . Inoltre, l'aumento della corrente I_{CaL} accoppiata ad una sua più lenta cinetica di inattivazione può contribuire all'aumentata durata dell'AP. Mentre non si sono registrate variazioni sostanziali del picco di corrente del Na^+ (I_{Na}), la componente tardiva del Na^+ (I_{NaL}) è risultata nettamente incrementata nei miociti HCM, con verosimile importante contributo all'allungamento della durata dell'AP. Infatti, la selettiva inibizione della I_{NaL} con ranolazina accorciava la durata di APs nei campioni HCM, mentre gli effetti erano trascurabili sui campioni controllo.

L'evidente effetto di riduzione dell'APD con la ranolazina, permette di identificare nella corrente I_{NaL} una causa determinante del remodeling elettrofisiologico e del prolungato AP nei miociti HCM. Oltre poi alla maggior ampiezza della I_{NaL} , la concomitante riduzione delle correnti ripolarizzanti del K^+ può rafforzare l'effetto della I_{NaL} sul l'allungamento dell'AP nei campioni HCM rispetto ai controlli (68). Complessivamente, il remodeling delle correnti transmembrana osservato nella HCM presenta similitudini con quanto riscontrato in modelli animali ed umani di ipertrofia cardiaca secondaria(63): queste comprendono una ridotta densità di corrente I_{to} (transient outward current) (64) e un'aumentata ampiezza con più lenta cinetica delle I_{CaL} (65), consentendo un incremento della durata del potenziale d'azione (66). Tuttavia, il marcato prolungamento dell'AP riscontrato nei cardiomiociti HCM rappresenta una caratteristica unica, che non è stata mai riportata per altre modelli non geneticamente determinati di ipertrofia.

Da notare inoltre, che la stimolazione β -adrenergica prolungava l'AP nei miociti HCM, un effetto paradossale se paragonato all'accorciamento osservato nei controlli (Fig.2e). La stimolazione β -adrenergica potenzia le correnti del K^+ e del Ca^{2+} (67), con un effetto prevalente su quelle del K^+ che determinano un accorciamento dell'APD nei cuori normali. L'alterato equilibrio tra le correnti del K^+ e del Ca^{2+} , come osservato nei miociti HCM, probabilmente consente una relativa predominanza dell'effetto β -adrenergico sulle correnti del Ca^{2+} rispetto a quelle del K^+ , risultandone un netto prolungamento dell'APD. Il livello fluttuante di catecolamine in circolo (es. durante lo stress o l'esercizio) potrebbe determinare un prolungamento dell'APD e dell'intervallo QT, incrementando il rischio di aritmie; da notare che nei pazienti HCM, un'aumentata variabilità durante il giorno dell'intervallo QT è considerata predittiva di aritmie (68).

Alterazione dell'accoppiamento eccitazione-contrazione nei miociti HCM. La principale anomalia dell'ECC nei miociti HCM è la prolungata durata del transiente del Ca^{2+} e l'aumento diastolico del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (fig4). Queste osservazioni sono in accordo con quanto riportato in altri lavori che utilizzavano campioni da cuori di pazienti HCM end-stage (33). La più lunga durata del potenziale d'azione in miociti HCM contribuisce ad alterare la cinetica del transiente del Ca^{2+} . Tuttavia, il transiente del Ca^{2+}_i evocato da brevi depolarizzazioni pulsate in modalità voltage-clamp mostra comunque una lenta ascesa e un lento decadimento nei miociti HCM. (fig5). Quindi, si può ipotizzare che, oltre al prolungamento dell'APD, anche perturbazioni nelle diverse componenti dell'accoppiamento eccitazione-contrazione siano in parte responsabili della rallentata cinetica del Ca^{2+} , osservata nella HCM. Queste perturbazioni potrebbero coinvolgere: 1) SR Ca^{2+} -ATPase (SERCA): la ridotta velocità di decadimento del transiente del Ca^{2+} osservata nei miociti HCM suggerisce una ridotta attività del SERCA. In accordo a questo, nel miocardio HCM l'espressione genica del SERCA è ridotta, mentre quella del fosfolambano è simile ai controlli, in linea con precedenti riscontri di ridotta attività del SERCA nel miocardio HCM (71). Variazioni di espressione, funzione e modulazione del SERCA sono peraltro state descritte in diversi modelli di ipertrofia cardiaca, sia in modelli animali di ipertrofia ipertensione correlata (70), sia in modelli transgenici di HCM; 2) lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX): gli esperimenti con caffeina indicano che l'estrusione del Ca^{2+} (forward-mode) da parte dello scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ è ridotta nei miociti HCM, in apparente contrasto con l'aumentata espressione genica del NCX. Questa discrepanza può essere spiegata da uno shift negativo dello NCX dovuto all'aumentata concentrazione intracellulare di sodio (reversal potential): la conseguenza di un potenziato reverse-mode e di un ridotto forward-mode dell'attività di NCX, può spiegare la più lenta cinetica del transiente del Ca^{2+} .

Il cuore insufficiente è caratterizzato da un ridotto carico di Ca^{2+} nel SR e da un'alterata ampiezza della corrente del Ca^{2+} (72). Tuttavia, nei cardiomiociti HCM si è riscontrato un aumento del carico di Ca^{2+} del RS e una normale corrente del Ca^{2+} , analogamente a quanto riportato in studi su animali con ipertrofia compensata (73). Ma se l'attività del SERCA è ridotta, quale meccanismo è in grado di mantenere un elevato carico di Ca^{2+} nel SR? L'ipotesi che si propone è che l'aumento della I_{NaI} determina un incremento della concentrazione intracellulare del Na^+ nei miociti malati (46), favorendo l'ingresso di Ca^{2+} attraverso il reverse-mode del NCX, come osservato nell'ipertrofia secondaria (74). Associato così alla sovraespressione del NCX, il meccanismo induce un incremento dell'ingresso di Ca^{2+} durante la fase di plateau del potenziale d'azione, e consente al miocardio HCM di mantenere un normale livello di calcio nel SR (75), l'ampiezza di corrente di Ca^{2+} (76) e la forza contrattile. Infatti, in contrasto con il miocardio dei cuori insufficienti e con precedenti report su campioni di cuori HCM end-stage (77), le misure di tensione attiva effettuate in questo studio mostrano che il muscolo HCM non presenta un relazione negativa forza-frequenza (Fig.9f) e ha una preservata riserva contrattile.

Comunque, l'accumulo intracellulare del Na^+ dovuto alla aumentata I_{NaI} potrebbe peggiorare la funzione del NCX (forward -mode), inducendo riduzione dell'estrusione di Ca^{2+} osservata durante l'esposizione alla

caffaina e probabilmente contribuire al rallentato decadimento del transiente del Ca^{2+} e all'incremento della sua concentrazione diastolica, in combinazione con la ridotta attività del SERCA. Il sovraccarico di Ca^{2+} nel SR e del carico diastolico sono associati allo spontaneo rilascio di Ca^{2+} dal SR che determina onde di Ca^{2+} , probabilmente responsabili dell'aumentata frequenza di post-depolarizzazioni tardive nei miociti HCM.

Sebbene questi adattamenti del Ca^{2+} handling siano efficaci nel preservare sia l'ampiezza di corrente del Ca^{2+} , sia la forza di contrazione, le anomalie della cinetica del Ca^{2+} probabilmente rendono conto del prolungato rilasciamento osservato sulle trabecole HCM, consistente con precedenti osservazioni su miocardio HCM umano (77). Le alterazioni meccaniche del rilasciamento miocardico sono considerate come causa primaria della disfunzione diastolica nella HCM e uno dei principali determinanti dell'intolleranza all'esercizio, comune nei pazienti con cardiomiopatia ipertrofica. Quindi, il ripristino di fisiologiche concentrazioni intracellulari di Na^+ potrebbe verosimilmente migliorare l'omeostasi del calcio e ridurre la disfunzione diastolica nei pazienti HCM.

Azione della Ranolazina sulle anomalie elettrofisiologiche e contrattili: meccanismo e prospettive. In questo studio, la ranolazina ha agito efficacemente su diverse alterazioni cellulari osservate nei cardiomiociti HCM, determinando un miglioramento delle funzioni elettrofisiologiche e meccaniche del miocardio. L'ipotesi è che il meccanismo fondamentale alla base degli effetti meccanici ed elettrofisiologici sui cardiomiociti HCM della ranolazina sia rappresentato dall'inibizione della corrente tardiva del Na^+ (I_{NaL}). La ranolazina agisce minimamente sul miocardio di controllo, confermando così la selettività per il tessuto malato in relazione alla alta densità di I_{NaL} nei miociti HCM.

La riduzione della corrente tardiva del Na^+ durante la fase di plateau del potenziale d'azione accorcia direttamente la durata dell'AP dei miociti HCM (Fig.7), con un effetto più pronunciato su quelle cellule che mostrano un più lungo APD ($\text{APD}_{90\%} > 1000\text{ms}$). Quindi, l'inibizione della I_{NaL} può essere più efficace in regioni con marcato rimodellamento elettrofisiologico, riducendo così le differenze di APD, e verosimilmente la dispersione del QT e l'associato rischio aritmico. Inoltre l'inibizione della I_{NaL} può ridurre la variabilità battito-battito dell'APD su cuori HCM, che è noto potenziare la dispersione della ripolarizzazione e consentire la formazione di circuiti di rientro. Un più breve APD e una più omogenea ripolarizzazione dovuti al blocco della I_{NaL} per effetto della ranolazina, riducono anche la frequenza di EAD sui cardiomiociti HCM (fig7e). Questo effetto supporta l'ipotesi di un ampio spettro di attività antiaritmica della ranolazina nella HCM, simile a quella osservata nei trials clinici sulle patologie cardiache ischemiche (53).

Oltre a ciò, la ranolazina è sembrata efficace anche sulle alterazioni del Ca^{2+} handling osservate nei cardiomiociti HCM, probabilmente sempre per azione sulla I_{NaL} . Riducendo il sovraccarico di Na^+ intracellulare, il farmaco potrebbe ripristinare una corretta estrusione del Ca^{2+} per mezzo del NCX (forward mode); in questo modo, il più veloce decadimento del transiente del Ca^{2+} ed il più basso carico diastolico $[\text{Ca}^{2+}]_i$ spiegherebbero, rispettivamente, l'accorciamento del rilasciamento e una riduzione della tensione

diastolica nelle trabecole HCM quando esposte alla ranolazina. Globalmente quindi, questi risultati suggeriscono un potenziale effetto positivo dell'inibizione della I_{NaL} nel ridurre la disfunzione diastolica dei pazienti HCM. Inoltre, l'inibizione della I_{NaL} con ranolazina, diminuendo la concentrazione diastolica del Ca^{2+}_i e il carico del SR, ha ridotto anche la prevalenza di DADs, mostrando come una normalizzazione del Ca^{2+} handling intracellulare potrebbe significare un'ulteriore positiva proprietà antiaritmica del farmaco.

Un apparente effetto collaterale della ranolazina è rappresentato dalla sua azione inotropica negativa osservata sulle trabecole HCM, come risultato della ridotta ampiezza del transiente di Ca^{2+}_i e del carico di Ca^{2+} nel SR. Tuttavia, la cardiomiopatia ipertrofica è caratterizzata da un'esaltata contrattilità, che a sua volta è uno dei fattori determinanti l'ostruzione all'efflusso (19). Classicamente, la disopiramide è impiegata nelle forme ostruttive della HCM per ridurre il gradiente intraventricolare e i sintomi, grazie alle sue proprietà inotrope negative (78). Quindi, il blocco della I_{NaL} con ranolazina sembra una sicura opzione terapeutica, ottenendo medesimo effetto inotropo negativo sui pazienti HCM.

L'aumentato livello di Ca^{2+} citosolico nei cardiomiociti è considerato tra le principali conseguenze delle mutazioni sarcomeriche HCM correlate, dovuto sia ad aumentata sensibilità al Ca^{2+} dei miofilamenti (79) sia alla ridotta attività del SERCA causata dalla deplezione energetica miocardica (80), determinando un lento decadimento della corrente transiente del Ca^{2+} (81). Il cronico aumento del Ca^{2+} citosolico determina poi una cronica attivazione di diverse vie enzimatiche, tra cui la cascata della Ca^{2+} -calmodulina chinasi (Ca^{2+} -calmodulin Kinase – CamKII), che è implicata nello sviluppo della patologica ipertrofica dei miociti (82). Consistente con questa osservazione, si è riscontrato, in precedenza, un aumento di tre volte della fosforilazione della CamKII nel miocardio dei pazienti HCM (83). Prevenendo l'instaurarsi del sovraccarico intracellulare di Ca^{2+} con l'uso di verapamil, un calcio-antagonista, in topi transgenici portatori di mutazione della miosina HCM correlata, si è attenuato e ritardato lo sviluppo dell'ipertrofia ventricolare e della disfunzione diastolica. (84). In modo simile, la riduzione del carico di Ca^{2+} intracellulare indotto dalla ranolazina potrebbe influire sul remodeling a lungo termine dei cardiomiociti di cuori HCM, offrendo un ulteriore benefico effetto per somministrazioni prolungate. L'inibizione della I_{NaL} , rispetto ai Ca^{2+} -antagonisti, può rappresentare una più sicura e meglio tollerata opzione terapeutica nel prevenire l'espressione fenotipica franca della HCM nei soggetti portatori di mutazioni sarcomeriche, come suggerito dal profilo della ranolazina in termini di sicurezza ed effetti collaterali. Per tutte queste ragioni, i potenziali effetti positivi a lungo termine del blocco della corrente I_{NaL} nell'invertire il remodeling miocardico della HCM o prevenendone lo sviluppo, appare un'ipotesi attraente per sostenere ulteriori studi clinici e sperimentali.

Lo studio descritto sembra sia riuscito a correlare caratteristiche cliniche e strumentali dei pazienti HCM con i dati pre-clinici da miociti isolati; molte delle caratteristiche elettrofisiologiche dei pazienti HCM possono essere spiegate da specifiche proprietà elettrofisiologiche che sono state identificate sui miociti settali isolati. Gli effetti osservati della ranolazina, insieme con la selettività di azione sui campioni HCM, ne

farebbero il farmaco ideale per il trattamento della HCM, poiché ridurrebbe il rischio aritmico, migliorerebbe la funzione diastolica e agendo sull'ipercontrattilità settale, ridurrebbe l'ostruzione all'efflusso. Tuttavia, l'interpretazione dei meccanismi d'azione del farmaco sui miociti HCM è indebolita dai limiti intrinseci all'approccio seguito in questo studio. Malgrado il grande vantaggio di studiare direttamente la malattia su pazienti, l'impiego di campioni umani soffre di alcune limitazioni: 1) il numero di campioni disponibili è limitato, ed il numero di cellule utilizzabili è abbastanza ridotto; questo restringe il numero di protocolli sperimentali che possono essere eseguiti, rendendo difficile la comprensione di così complessi effetti farmacologici; 2) l'interpretazione dei dati da campioni umani è resa difficile dalla variabilità tra i pazienti, che differiscono per età, sesso, terapia e differenti risposte alla malattia; 3) nel nostro studio solo un certo stadio di malattia è stato investigato, perché la coorte di pazienti indagata comprendeva un sottogruppo con ipertrofia massiva del setto ed ostruzione del LVOT: questo rende impossibile comprendere la progressione della malattia e gli effetti della ranolazina nelle differenti fasi della HCM ; 4) l'approccio sperimentale seguito consente lo studio solo degli effetti acuti della ranolazina sul tessuto HCM, ma non si possono individuare effetti a medio e lungo termine del farmaco né eventuali riscontri sulla progressione della malattia.

L'impiego di modelli animali di HCM può superare i limiti elencati e consentire una più completa caratterizzazione dei meccanismi d'azione della ranolazina senza effetti confondenti. Inoltre, la malattia potrebbe essere indagata in ogni fase, e nelle diverse espressioni fenotipiche, indagando così gli effetti della ranolazina in diversi contesti. Infine, la possibilità di monitorare modelli animali mutanti dalla nascita alla morte, permetterebbe di valutare gli effetti a lungo termine del farmaco sulla progressione della malattia e verificare se l'utilizzo della ranolazina possa prevenire l'espressione fenotipica in soggetti sani portatori di mutazione.

In conclusione, i dati pre-clinici ottenuti da campioni umani suggeriscono un effetto elettrofisiologico favorevole della ranolazina sui cardiomiociti HCM. Nei pazienti con HCM, la ranolazina rappresenta un'opzione promettente, agendo con effetti favorevoli su differenti aspetti critici della loro condizione. Riducendo il sovraccarico di Na^+ intracellulare e quindi quello diastolico di Ca^{2+} , la ranolazina ha le potenzialità per migliorare la funzione diastolica, causa di sintomi in molti pazienti con HCM con impatto importante sulla capacità funzionale e sulla qualità di vita. Nel lungo termine, gli effetti sull'omeostasi del calcio potrebbero esitare in una correzione dei processi di remodeling miocardico, strettamente dipendente dai segnali miocitari (remodeling della matrice extracellulare, riduzione della proliferazione fibroblastica e della produzione di collagene nel miocardio ipertrofico). Inoltre la somministrazione di ranolazina ha dimostrato di ridurre il grado di ipertrofia miocitaria e di fibrosi interstiziale, e ridurre il rischio di aritmie (53). Peraltro, il farmaco è risultato efficace nel migliorare la perfusione miocardica, sia indirettamente, normalizzando la densità capillare nel ventricolo, sia come pure in pazienti affetti da CAD stabile, direttamente per azione sulla microcircolo migliorando la funzione endoteliale (86). Quindi il

trattamento con la ranolazina potrebbe alleviare l'angina dei pazienti con HCM , e dato molto importante, prevenire la progressione della malattia verso un fase end-stage agendo proprio su un suo determinante critico: l'ischemia microvascolare. Nel complesso appaiono razionali le ragioni che spingono a investigare l'efficacia della ranolazina per la terapia della cardiomiopatia ipertrofica, orfana ad oggi di uno specifico trattamento farmacologico.

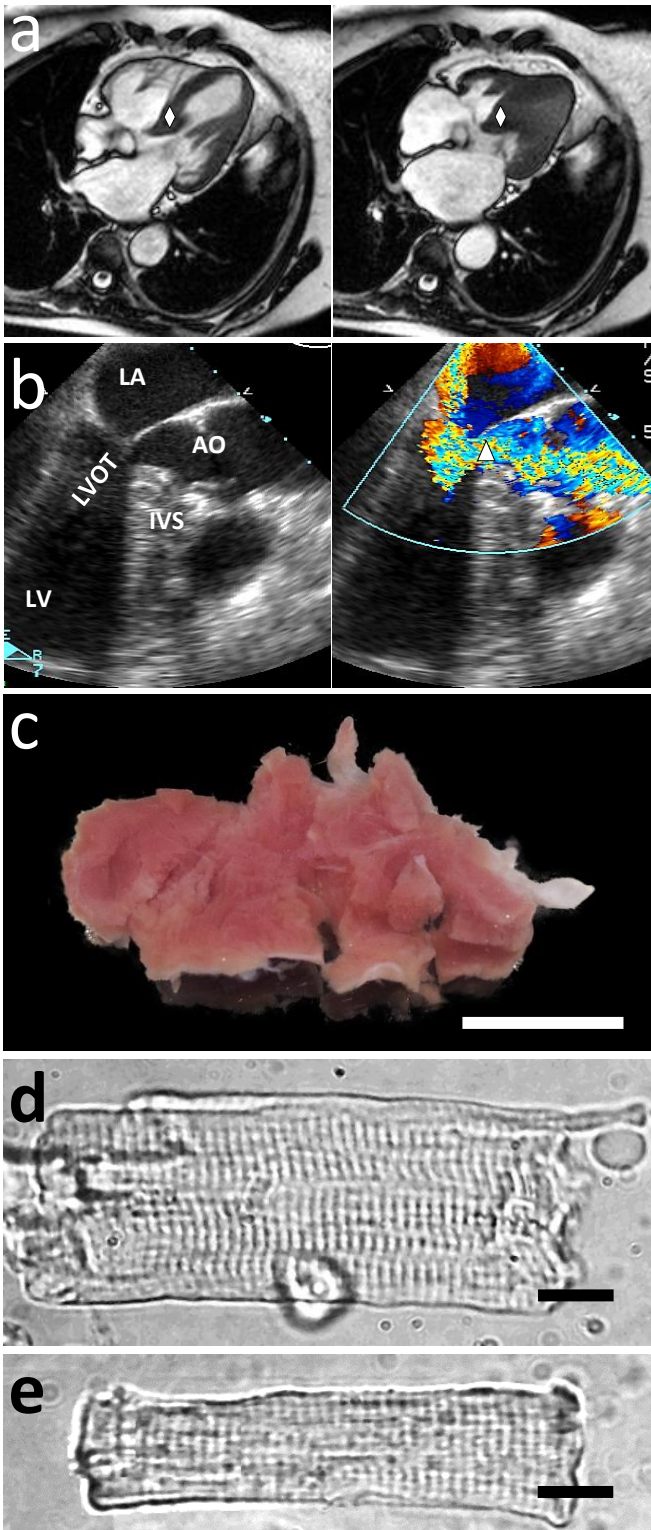


Figura 1: Miectomia settale e cardiomiocita HCM. a)immagine di MRI in telediastole (sinistra) e telesistole(destra) in un paziente che mostrava ipertrofia asimmetrica del setto; \diamond indica il setto. b)ecocardiografia transesofagea: ostruzione al tratto di efflusso (sinistra) che determina un flusso accelerato con turbolenza e sviluppo di SAM (Δ destra): LA=atrio sinistro; LV =ventricolo sinistro; AO=aorta ascendente; LVOT=LV tratto di efflusso ;IVS= setto interventricolare. c)Frammento di miectomia, Barra di rif=1cm. d) Miocita isolato da campione di miectomia in un paziente HCM. Barra di rif=10 μ m. e)Miocita isolato da un campione settale in un paziente del gruppo di controllo, Barra di rif= 10 μ m. Volume cellulare: 33.5 ± 4.3 pL in miociti HCM vs 17.6 ± 3.2 pL in miociti controllo ($p < 0.05$)

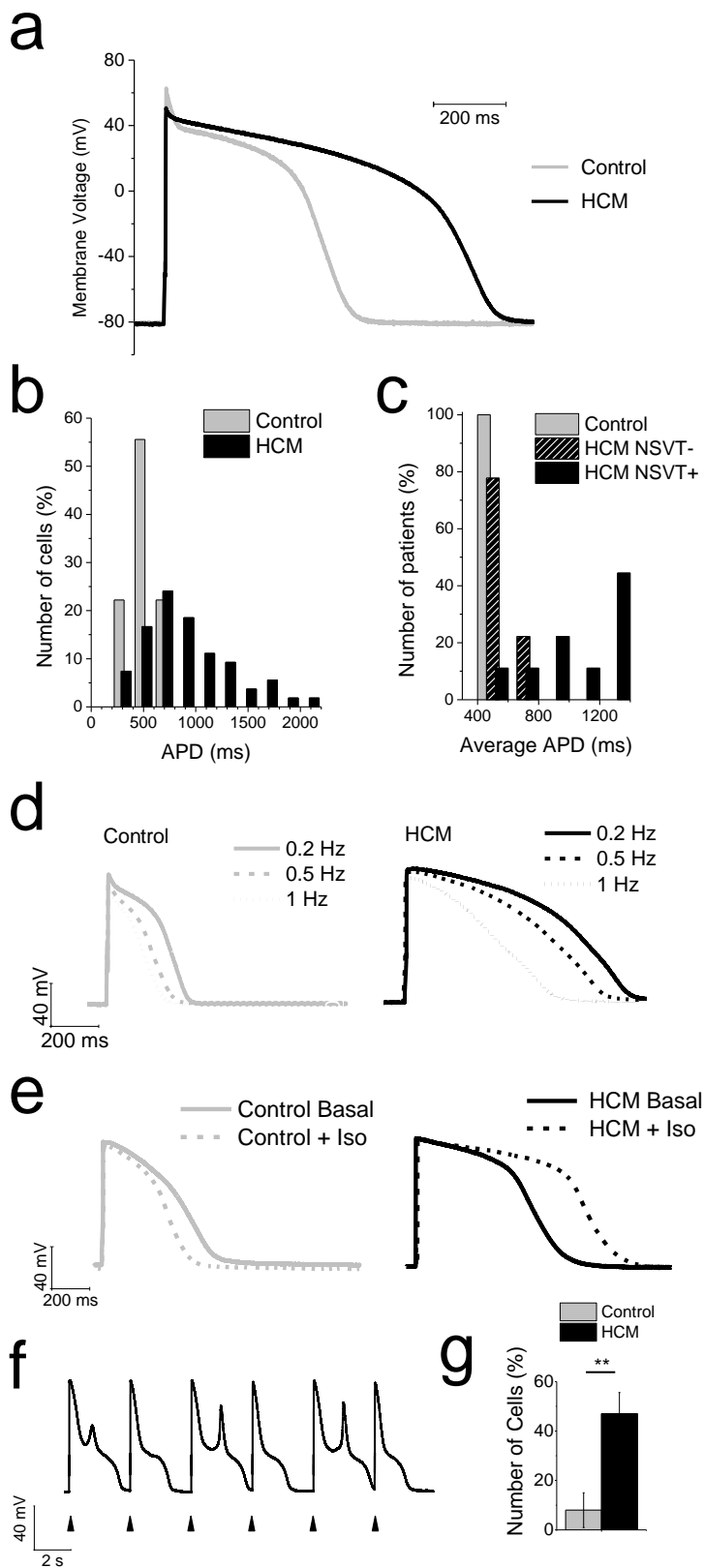


Figura 2: Potenziali d'azione prolungati nei cardiomiociti HCM. a) Rappresentazione sovrapposta dei potenziali d'azione registrati durante stimolazione a 0.2Hz in cardiomiociti HCM (nero) e nei controlli (grigio). b) Distribuzione dell'APD90% a 0.2Hz da 62 cardiomiociti HCM (nero) e 22 cellule controllo (grigio). c) Distribuzione della media dell'APD90% da pazienti controllo (colonne grigie), 13 pazienti con (NSVT+) e 13 senza (NSVT-) storia documentata di NSVT (NSVT - colonne a righe / NSVT+ colonne nere). La media dell'APD era calcolata da ogni paziente calcolando la media degli APDs delle cellule provenienti dallo stesso paziente. d) Rappresentazione di potenziali d'azione evocati a 0.2Hz (traccia continua), a 0.5Hz (traccia tratteggiata), e a 1Hz (traccia punteggiata) nei miociti di controllo (sinistra) e in quelli HCM (destra). e) RegISTRAZIONI degli APDs basali e dopo stimolazione con isoproterenolo 10-7 M (linea tratteggiata) nei miociti controllo (sinistra) e in quelli HCM (destra). Nota: L'isoproterenolo ha effetto opposto sull'APD nei miociti HCM vs controlli f) registrazione del potenziale di membrana da un cardiomiocita stimolato a 0.2Hz, che mostra depolarizzazioni precoci (EADs) durante la fase di plateau. Le frecce indicano gli stimoli. g) Frequenza di EADs in 46 cardiomiociti HCM vs 18 controlli (**= $p < 0.01$ unpaired t-test)

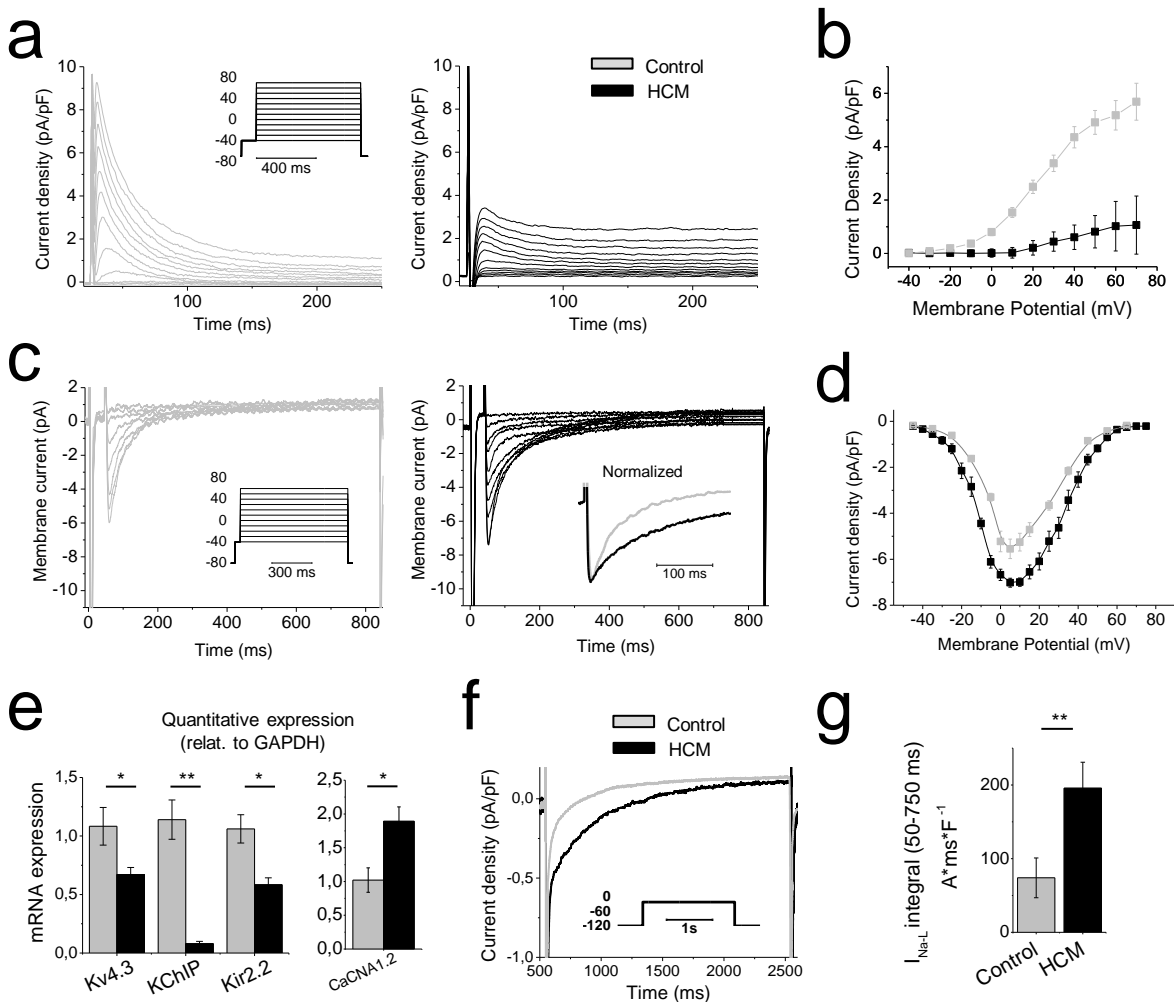


Figura 3: Alterazioni delle correnti transmembrana nella HCM. a,b) Corrente outward K^+ (I_{to}). a) i miociti di controllo mostrano una chiara corrente outward I_{to} (pannello a sinistra), mentre quelli HCM presentano una minima corrente I_{to} (pannello centrale); b) la relazione voltaggio-densità di corrente mostra come per ogni voltaggio, I_{to} sia ridotta nei miociti HCM (13 cellule) rispetto ai controlli (6 cellule) (pannello a destra)

c,d) Corrente L-type Ca^{2+} (I_{CaL}). c) Traccia nei miociti controllo (a sinistra) vs miociti HCM (al centro). L'inserito nel pannello centrale mostra la corrente I_{CaL} normalizzata a 0 mV per i miociti controllo (grigio) vs quelli HCM, evidenziando la differente cinetica di inattivazione nei due gruppi. d) relazione voltaggio-densità I_{CaL} per i miociti controllo vs HCM (pannello a destra); se l'ampiezza è significativamente differente, la forma delle due curve è simile. Nota: tanto per I_{to} quanto per I_{CaL} la relazione voltaggio-dipendenza è stata valutata partendo da un potenziale di riposo di -80 mV, dopo un breve pre-impulso a -40 mV per inattivare la corrente Na^+ , e quindi applicando step di depolarizzazione da -40 mV a +70 mV.

e) Espressione quantitativa del mRNA per la principale subunità della I_{to} ($Kv4.3$) e la subunità secondaria ($KChIP$), per la Inward rectifier K^+ current (I_{K1}) il canale $Kir2.2$, e per la principale subunità della I_{CaL} ($CaCNAL2$) nei controlli (14 controlli - grigio) e nei miociti HCM (14 HCM - nero).

f) Traccia della corrente del Na^+ nei miociti controllo (grigio) e in quelli HCM, durante depolarizzazioni a -20 mV partendo da un potenziale di riposo di -120 mV. g) Media della corrente I_{NaL} calcolata come integrale tra 50 ms e 750 ms nei miociti controllo (grigio) vs HCM (nero). Media \pm SE da 5 controlli e 12 miociti HCM. * = $p < 0.05$ unpaired t-test; ** = $p < 0.01$ unpaired t-test

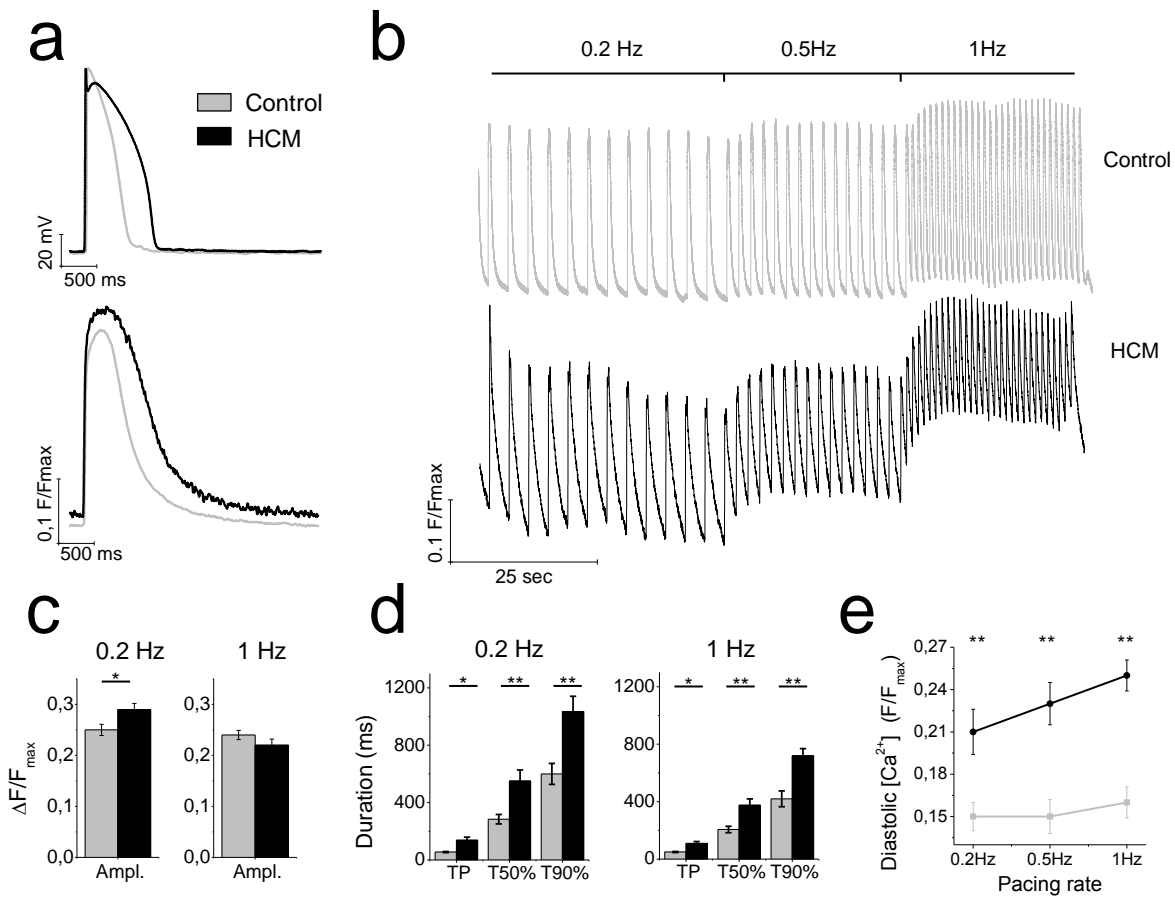


Figura 4: Alterazioni del Transiente del Ca^{2+} e del carico diastolico di $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nella HCM. a) Il transiente del Ca^{2+} registrato in modalità current-clamp mentre viene evocato e registrato il potenziale d'azione a 0.2Hz. Nella traccia superiore si mostra il potenziale d'azione in sovrapposizione, nei miociti controllo (grigio) e in quelli HCM (nero); nella traccia inferiore si riporta la corrispondente registrazione del transiente del Ca^{2+} dalle stesse due cellule. b) Registrazione prolungata del transiente del Ca^{2+} , evocata con frequenze di stimolazione di 0.2Hz, 0.5Hz e 1Hz, da miociti controllo (grigio – traccia superiore) e miociti HCM (nero – traccia inferiore) c) Ampiezza del transiente del Ca^{2+} a 0.2Hz e a 1Hz nei miociti controllo (colonne grigie) vs miociti HCM (colonne nere) d) Tempo di picco del transiente del Ca^{2+} (TP), tempo dal picco al 50% di decadimento (T50%) e tempo dal picco al 90% del decadimento (T90%) nei miociti controllo (colonne grigie) vs miociti HCM (colonne nere) a 0.2Hz e 1Hz. e) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ diastolico misurato come livello di fluorescenza a tre frequenze di stimolazione nei miociti HCM (traccia nera) e nei controlli (traccia grigia). Media \pm SE da 12 cellule controllo e 25cellule HCM

*= $p < 0.05$ unpaired t-test; ** = $p < 0.01$ unpaired t-test

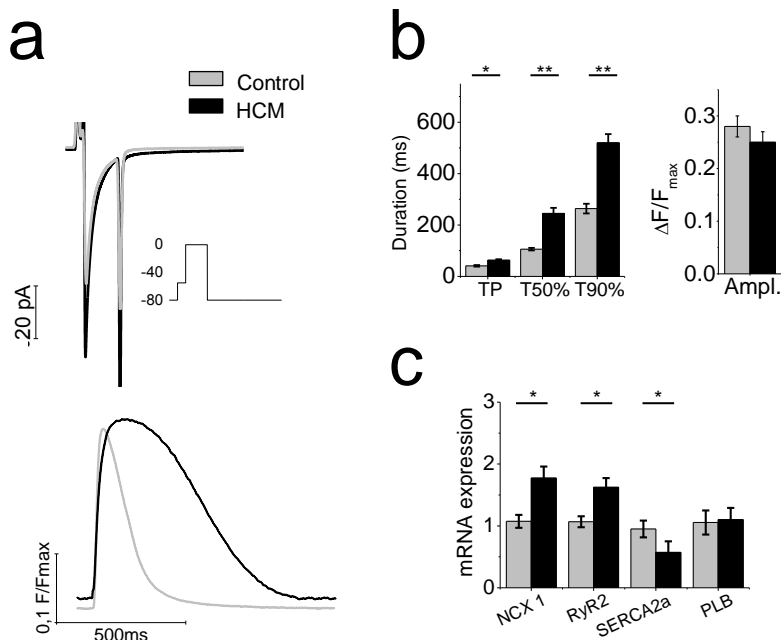


Figura 5: Alterazioni dell'accoppiamento eccitazione-contrazione (ECC) nella HCM. a) Tracce sovrapposte di correnti transmembrana del Ca^{2+} (superiore) e del calcio intracellulare [Ca^{2+}]i fluorescente (inferiore) durante brevi (100ms) impulsi depolarizzanti a 0mV in modalità voltage-clamp in miociti HCM (nero) e cellule controllo (grigio). b) Parametri del transiente del Ca^{2+} indotto ad 1Hz, nei miociti HCM (colonne nere) e nei controlli (colonne grigie); grafico a sinistra parametri della cinetica, grafico di destra =ampiezza. Media \pm SE da 14 controlli e 25 miociti HCM. c) Espressione mRNA per i geni dello scambiatore Na^{+}/Ca^{2+} (NCX), della Ca^{2+} - ATPase del reticolo sarcoplasmatico (SERCA), dei Recettori della Rianodina (RYR2) e del Fosfolambano (PLB). Media \pm SE da 14 HCM e da 14 controlli

* = $p < 0.05$ unpaired t-test; ** = $p < 0.01$ unpaired t-test

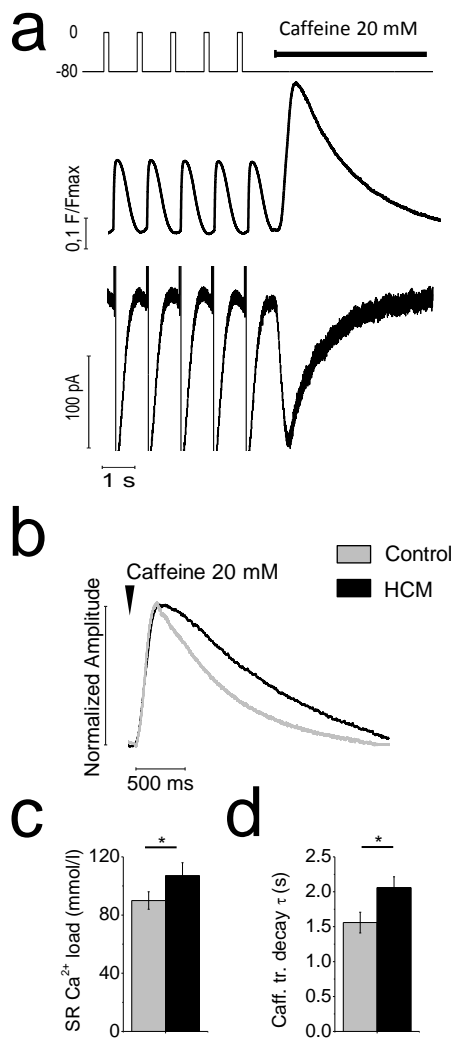


Figura 6: Carico del Calcio nel SR e funzione dello scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX). a) Traccia della fluorescenza del Ca^{2+} (superiore) e della corrente (inferiore) in miociti HCM durante il protocollo per la misura del contenuto calcico del SR. Dopo 20 steps di depolarizzazione a 0 mV, i miociti vengono mantenuti a -80mV mentre rapidamente vengono esposti a caffeina 20 μM . b) Tracce sovrapposte normalizzate della corrente del calcio caffeina-indotta in miociti HCM (nero) e nei controlli (grigio), per sottolineare la differenza nei tempi di decadimento della corrente. c) Il contenuto calcico del SR, calcolato dall'integrale della corrente inward durante esposizione alla caffeina, nei controlli (grigio) e nei miociti HCM (nero). d) Costante del tempo di decadimento della corrente caffeina-indotta nei controlli (colonna grigia) e nei miociti HCM (colonna nera). Media \pm SE da 14 cellule controllo e 25 cellule HCM. *= $p < 0.05$ unpaired t-test

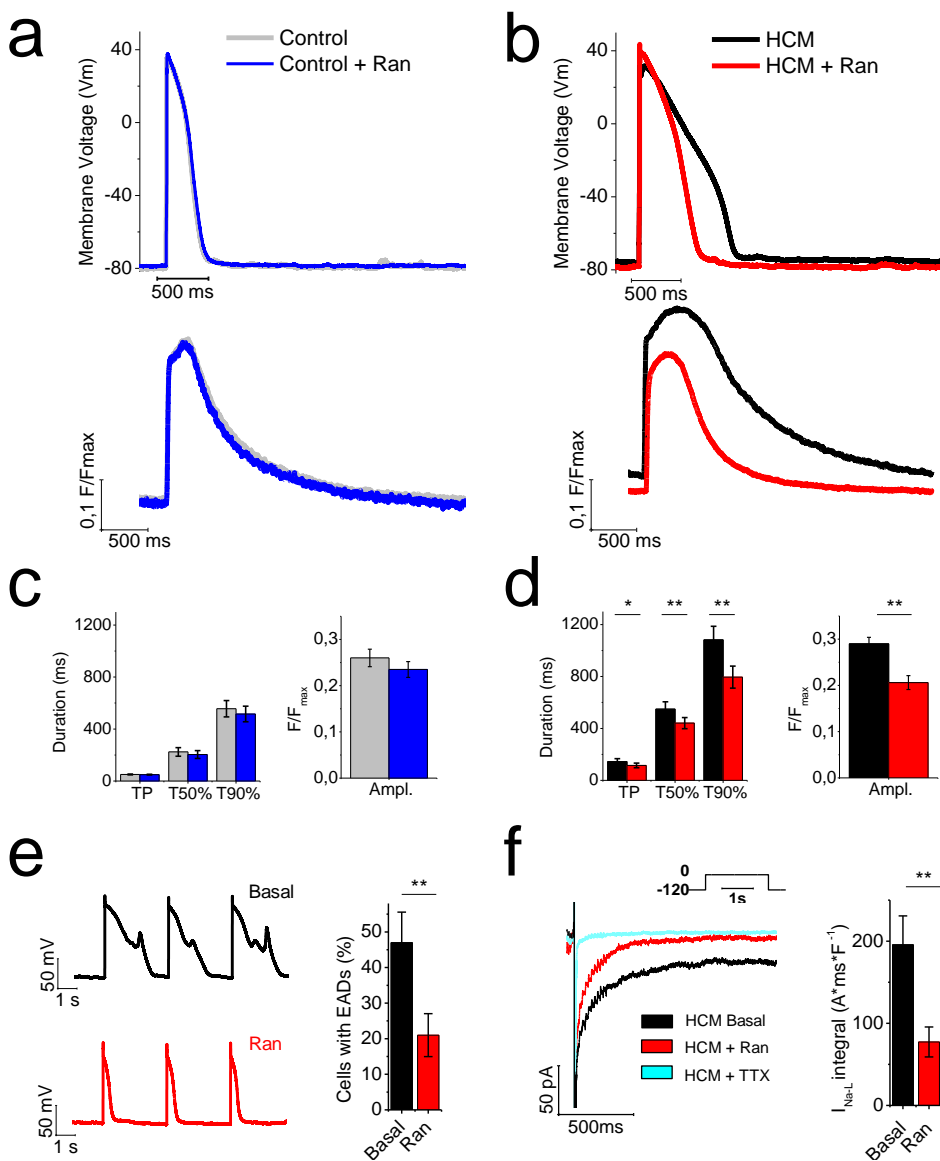
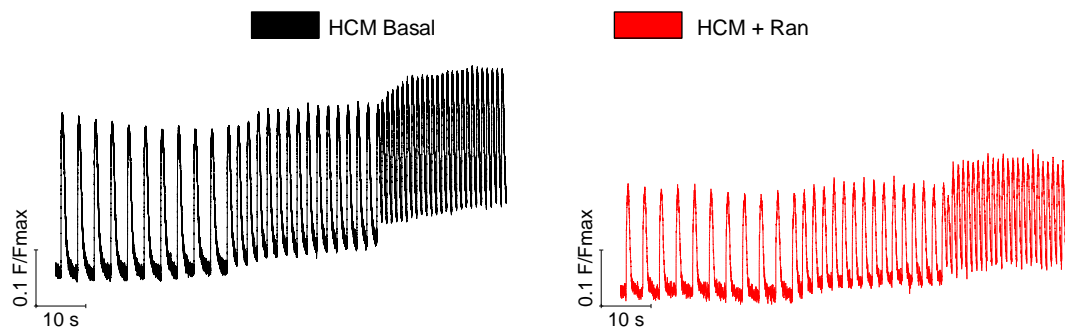


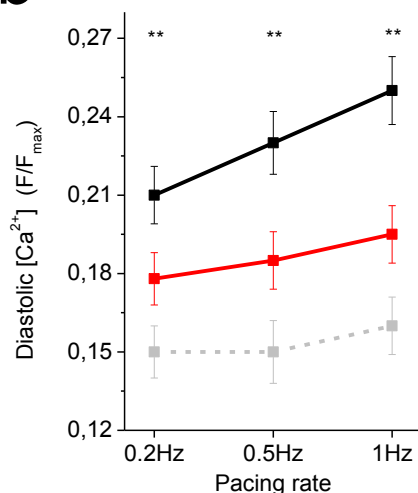
Figura 7: Effetti dell'inibizione della corrente del Na^+ (I_{NaL}) con Ranolazina $10\mu M$ sulla durata dell'AP e sul transiente del Ca^{2+} . a,b) Pannelli superiori: APs a 0.2Hz da miociti di controllo (a) e miociti HCM (b) prima e dopo esposizione alla ranolazina $10\mu M$ (tracce in rosso); Pannelli inferiori: corrispondenti transienti del Ca^{2+} nei due gruppi di cellule. c,d) Pannelli a sinistra: tempo di picco (TP), tempo dal picco al 50% di decadimento (T50%), e tempo dal picco al 90% di decadimento (T90%) del transiente del Ca^{2+} a 0.2Hz in assenza e in presenza di Ranolazina; Pannelli a destra: ampiezza del transiente del Ca^{2+} a 0.2Hz in assenza e in presenza della Ranolazina [media \pm SE da 9 cellule controllo (c) e 24 cellule HCM (d)]. e) La ranolazina riduce la frequenza di EADs nei miociti HCM. A sinistra: tracce di AP dai miociti HCM prima (nero) e durante (rosso) esposizione a ranolazina $10\mu M$. A destra: frequenza di EADs in 24 miociti HCM in assenza (colonna nera) e in presenza (colonna rossa) di Ranolazina. f) La Ranolazina inibisce la I_{NaL} nei miociti HCM. A sinistra: traccia della I_{NaL} dai miociti HCM durante depolarizzazione a -20mV in assenza di ranolazina ("Basal"), in presenza del farmaco (rosso) e in presenza di Tetrodossina (TTX $30\mu M$). A destra: Media dell'integrale di I_{NaL} calcolata tra 50 e 750ms da 12 miociti HCM in assenza ("Basal") e in presenza di Ranolazina (Ran).

*= $p < 0.05$ paired t-test; **= $p < 0.01$ paired t-test

a



b



c

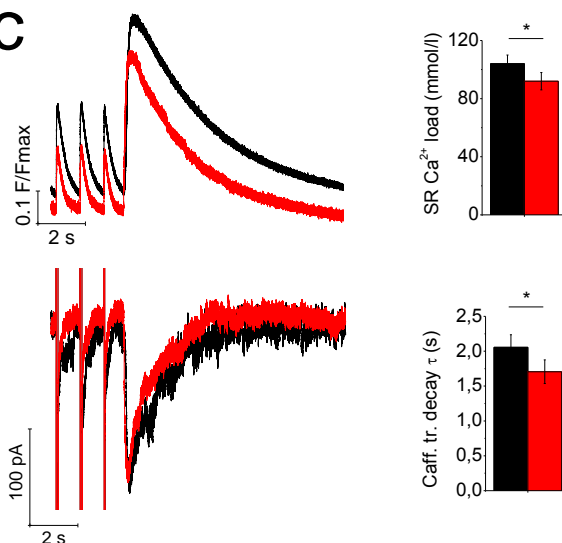


Figura 8: La Ranolazina riduce il Ca^{2+} diastolico, e il carico di Ca^{2+} del SR, promuovendo l'estrusione del Ca^{2+} attraverso lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX). a) Sequenze di correnti del Ca^{2+} stimulate a 0.2, 0.5 e 1Hz nei miociti HCM prima ("Basal", traccia nera) e dopo esposizione alla Ranolazina 10 μM ("Ran", traccia rossa). b) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ diastolico (stimato dai livelli diastolici di fluorescenza) dei miociti HCM a frequenze crescenti di stimolazione in assenza (nero) e in presenza (rosso) di Ranolazina 10 μM (medie \pm SE da 24 miociti HCM). Il livello di $[\text{Ca}^{2+}]_i$ diastolico nei miociti di controllo (grigio), è invariato in presenza di ranolazina. c) Sinistra: tracce sovrapposte della fluorescenza del Ca^{2+} (superiore) e della corrente del Ca^{2+} (inferiore) da miociti HCM prima (nero) e dopo Ranolazina (rosso) durante esposizione a caffeina 20mM per misurare il contenuto di Ca^{2+} del SR. A destra: il carico di Ca^{2+} del SR (diagramma superiore) e la costante di tempo (τ) del tempo di decadimento della corrente Ca^{2+} -caffeina indotta nei miociti HCM in assenza (colonne nere) e in presenza (colonne rosse) di Ranolazina 10 μM (media \pm SE da 25 miociti)

*= $p < 0.05$ paired t-test; **= $p < 0.01$ paired t-test

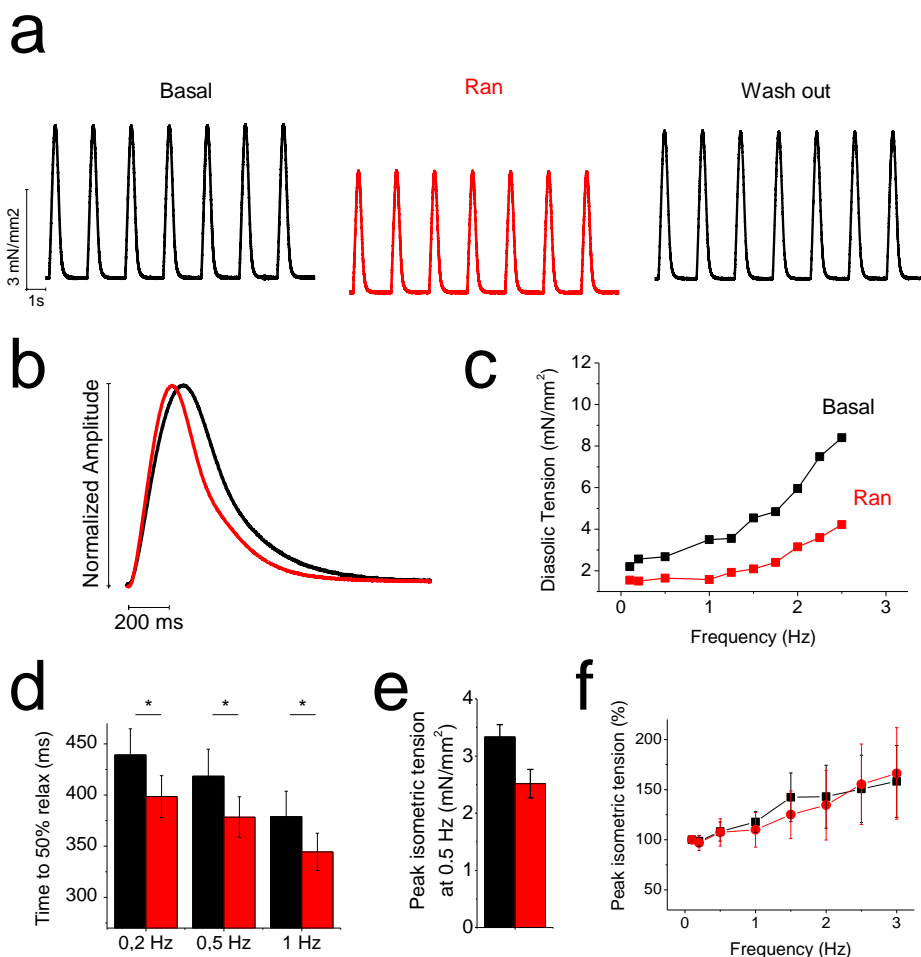


Figura 9: Effetti della Ranolazina sulla contrazione delle trabecole HCM intatte. a) Registrazioni di contrazioni isometriche di trabecole HCM stimulate a 0.5Hz prima ("Basal" , nero), dopo esposizione alla Ranolazina 10 μ M ("Ran", rosso), e 15min dopo washout del farmaco (Washout). b) Contrazioni prima (nero) e durante esposizione alla Ranolazina (rosso) in tracce sovrapposte per meglio illustrare l'effetto del farmaco sulla cinetica di contrazione dei campioni HCM (stesso esperimento che in a). c) Tensione diastolica di trabecola HCM a differenti frequenze di stimolazione prima (nero) e dopo esposizione alla Ranolazina (10 μ M, rosso)(stesso esperimento che in a). d) Tempo dallo stimolo al 50% di rilasciamento delle trabecole HCM a differenti frequenze di stimolazione in assenza (colonne nere) e in presenza di Ranolazina (colonne rosse)(media \pm SE di 11 trabecole da 8 pazienti HCM, *=p<0.05 paired t-test). e) Picco di tensione isometrica delle trabecole HCM a 0.5Hz in assenza (colonna nera) e in presenza di ranolazina (10 μ M, colonna rossa) (media \pm SE dalle stesse trabecole in d, p=0.067). f) Relazione frequenza-picco di tensione isometrica delle trabecole HCM in assenza (traccia nera) e in presenza (traccia rossa) di Ranolazina 10 μ M (il picco di tensione è espresso come % del picco di tensione a 0.1Hz; media \pm SE dalle stesse trabecole in d).

Tabella 1. Dati Clinici ed Analisi delle Mutazioni

Popolazione	N= 26 pazienti HCM
<i>Maschi</i>	15(58%)
<i>Età alla diagnosi (aa)</i>	38±10
<i>Età all'intervento(aa)</i>	47±14
<i>Storia familiare di HCM</i>	7/26 (27%)
<i>Storia positiva per morte improvvisa</i>	13/26 (50%)
<i>NYHA al momento dell'intervento</i>	2.5±0.5
<i>Classe I</i>	0 (0%)
<i>Classe II</i>	13 (50%)
<i>Classelll</i>	13 (50%)
<i>Angina pectoris</i>	7 (27%)
<i>Sincope</i>	14 (53%)
<i>Storia di fibrillazione atriale</i>	7 (27%)
<i>Terapia</i>	26 (100%)
<i>Beta-bloccanti</i>	25/26 (96%)
<i>Verapamil</i>	2 (8%)
<i>Amiodarone</i>	4 (15%)
<i>Disopiramide</i>	12 (46%)
<i>Diuretici</i>	10 (42%)
<i>ACE-inibitori</i>	12 (42%)
<i>ICD</i>	6 (23%)
<i>Storia negativa per NSTV</i>	13 (50%)
<i>Storia positiva per NSTV</i>	13 (50%)

Screening Mutazioni	13/26
Miofilamenti negativi	3/13 (23%)
Miofilamenti positivi	10/13 (77%)
MYBCP3 (Proteina C)	6/13 (46%)
MYBPC (E258K)	2/13 (15%)
MYH7 (myosin heavy chain)	3/13 (23%)
Complesse (geni multipli)	1/13 (8%)

Tabella 2. Caratteristiche strumentali dei pazienti HCM (N=26)

ECG-12 derivazioni (preop)	
Ritmo sinusale	26 (100%)
FA cronica	0
PQ (ms)	168±21
QRS (ms)	104±11
QTc (ms)	460±27
Ecocardiografia (preop)	
Atrio sinistro diametro telesistolico (mm)	46±7
Atrio sinistro volume telesistolico (ml)	105±41
Spessore Massimo Parete LV (mm)	26±5
LV diametro telediastolico (mm)	46±7
LV diametro telesistolico (mm)	20±7
Frazione d'eiezione (%)	67±9
LVOT gradiente > 30 mmHg	26 (100%)
LVOT gradiente a riposo (mmHg)	73±30
Rigurgito mitralico moderato-severo	10 (38%)
E' (cm/s)	4.3±1.3
Pattern diastolico	
Normale	0
Alterato rilasciamento	12 (46%)
Pseudonormale	13 (50%)
Restrittivo	1 (4%)
Risonanza Magnetica Cardiaca (CMR)	
Area superficie corporea (m2)	1.9±0.2
Indice massa corporea (kg/m2)	26±4
LV volume telediastolico (ml)	139±41
LV volume telediastolico indicizzato (ml/m2)	75±19
LV volume telesistolico (ml)	42±23
LV volume telesistolico indicizzato (ml/m2)	22±12
LV massa (g)	237±85
LV massa indicizzata (g/m2)	121±42
Rapporto LV massa /volume	1.76±0.7
LV frazione d'eiezione	74±8

Tabella 3. Potenziali d'azione dei miociti settali HCM e dei controlli

0.2Hz	MDP (mV)	APA (mv)	APD20%(ms)	APD50%(ms)	APD90%(ms)	Max upstroke speed(V/s)
HCM n=62 N=26	-77±1#	111±2	559±80*	729±92*	916±104*	43±2#
Control n=15 N=5	-80±2	113±3	213±39	378±59	507±71	54±4
0.5Hz	MDP (mV)	APA (mv)	APD20%(ms)	APD50%(ms)	APD90%(ms)	Max upstroke speed(V/s)
HCM n=35 N=22	-76±2#	108±4	367±44#	477±47#	645±61#	42±2#
Control n=12 N=4	-79±3	110±4	178±34	347±55	442±71	53±5
1Hz	MDP (mV)	APA (mv)	APD20%(ms)	APD50%(ms)	APD90%(ms)	Max upstroke speed(V/s)
HCM n=51 N=25	-75±1#	110±2	283±21*	386±24#	501±27*	42±3#
Control n=14 N=5	-79±3	110±3	142±30	266±51	378±68	53±4
Changes 0.2Hz to 1Hz	MDP (mVchange)	APA (mVchange)	APD20%(%)	APD50%(%)	APD90%(%)	Max upstroke speed(%)
HCM n=51 N=25	+2±1	-1±1	-21±3%#	-22±3%#	-19±2%#	-0.7±1%
Control n=14 N=5	+2±1	-3±2	-37±6%	-33±4%	-29±4%	-1±2%

Media ±SE # =p<0.05vs control * =p<0.01 vs control n=numero di cellule, N=numero di pazienti

Tabella 4. Transienti del Calcio (current clamp) nei miociti HCM e nei controlli

0.2Hz	Diast fluo (a.u.)	Amplitude (a.u)	Time to peak(ms)	Time to 50% decay (ms)	Time to 90% decay (ms)
HCM n=21 N=7	807±154#	258±61#	138±21*	550±77*	1035±111*
Control n=9 N=4	581±74	342±38	55±4	284±32	599±55
0.5Hz	Diast fluo (a.u.)	Amplitude (a.u)	Time to peak(ms)	Time to 50% decay (ms)	Time to 90% decay (ms)
HCM n=21 N=7	913±154#	286±43	129±21*	459±52*	920±99*
Control n=9 N=4	612±76	317±2	51±4	256±34	206±23
1Hz	Diast fluo (a.u.)	Amplitude (a.u)	Time to peak(ms)	Time to 50% decay (ms)	Time to 90% decay (ms)
HCM n=21 N=7	927±162#	205±59	109±13*	375±43*	719±50*
Control n=9 N=4	653±83	276±38	49±4	206±23	419±55
Changes 0.2Hz to 1Hz	Diast fluo (%)	Amplitude (%)	Time to peak(%)	Time to 50% decay(%)	Time to 90% decay (%)
HCM n=21 N=7	+15±2%#	-22±3%*	-13±5%	-24±5%	-25±4%#
Control n=9 N=4	+7±3%	-8±1%	-7±3%	-28±7%	-37±4%

Media±SE #=p<0.05vs control *=p<0.01vs control n=numero di cellule, N=numero di pazienti

Tabella 5. Transienti del Calcio (voltage clamp) nei miociti HCM e nei controlli

1Hz	Ca2+ current (pA/pF)	Amplitude (a.u.)	Time to peak (ms)	Time to 50% decay(ms)	Time to 90% decay(ms)	SR Ca2+ load (mmol/L cyt)	Caffeine tr. Decay t
HCM n=22 N=8	-6.48±0.25#	861±148	63±4*	245±22*	520±34*	96±5#	2058±206#
Control n=14 N=4	-5.22±0.40	935±87	41±3	106±5	264±19	85±2	1660±198
2Hz	Ca2+ current (pA/pF)	Amplitude (a.u.)	Time to peak (ms)	Time to 50% decay(ms)	Time to 90% decay(ms)	SR Ca2+ load (mmol/L cyt)	Caffeine tr. Decay t
HCM n=22 N=8	-6.17±0.37#	729±235	61±4*	193±17*	389±17*	107±9#	1949±226#
Control n=14 N=4	-5.11±0.41	918±89	37±2	93±4	229±26	90±6	1582±238

Media±SE #=p<0.05 vs control *=p<0.01vs control n=numero di cellule, N=numero di pazienti

Tabella 5. Effetti della Ranolazine sui miociti HCM e sui controlli

Effetti sui Potenziali d'Azione

0.2Hz	MDP (mV difference)	APA (mV difference)	APD50% (%change)	APD90% (%change)	Max upstroke speed (%)
HCM n=19 N=7	-2±1	-1±1	-22±5%#	-23±3%#	-1±3%
Control n=8 N=4	-3±2	-1±1	-7±4%	-8±5%	-4±3%
1Hz	MDP (mV difference)	APA (mV difference)	APD50% (%change)	APD90% (%change)	Max upstroke speed (%)
HCM n=19 N=7	-2±1	0±1	-15±3%#	-19±2%#	-4±3%
Control n=8 N=4	-2±2	-1±2	-5±3%	-7±4%	-3±2%

Effetti sul Transiente del Calcio (current clamp)

0.2Hz	Diast fluo (%change)	Amplitude (%change)	Time to peak (%change)	Time to 50% decay (%)	Time to 90% decay (%)
HCM n=13 N=6	-13±2%#	-30±4%#	-16±3%*	-17±2%#	-18±2%*
Control n=7 N=4	-5±1%	-10±4%	-2±1%	-7±3%	-7±2%
1Hz	Diast fluo (%change)	Amplitude (%change)	Time to peak (%change)	Time to 50% decay (%)	Time to 50% decay (%)
HCM n=13 N=6	-20±2%#	-21±4%*	-12±2%*	-18±2%#	-15±2%*
Control n=7 N=4	-10±3%	-4±3%	-1±2%	-7±3%	-4±2%

Effetti sul Transiente del Calcio (voltage clamp) e sul Ca²⁺ load del SR

1Hz	Amplitude (%change)	Time to peak (%change)	Time to 90% decay (%)	SR ca ²⁺ load(mol/L cyt)	Caffeine tr. Decay T
HCM n=14 N=6	-9±3%	-11±3%	-12±3%	-11±2%	-17±5%

Media±SE #=p<0.05vs control *=p<0.1vs control n=numero di cellule, N=numero di pazienti

Bibliografia

- 1) Maron BJ (2002). Hypertrophic cardiomyopathy: a systematic review. *Jama* 287; 1308-1320
- 2) Klues HG, Schiffers A, Maron BJ (1995). Phenotypic spectrum and patterns of left ventricular hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy :morphologic observations and significance as assessed by two dimensional echocardiography in 600 patients. *J Am Coll Cardiol* ;26:1699-708
- 3) Maron MS, Maron BJ, Harrigan C, Buys J, Gibson CM, Olivetto I, Biller L, Lesser JR, Udelson JE, Manning WJ, Appelbaum E (2009). Hypertrophic cardiomyopathy phenotype revisited after 50 years with cardiovascular magnetic resonance. *J Am Coll Cardiol*;54:220-8
- 4) Nistri S, Olivetto I, Betocchi S, Losi MA, Valsecchi G, Pinamonti B, Conte MR, Casazza F, Galderisi M, Maron BJ, Cecchi F (2006). Prognostic significance of left atrial size in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol*; 98:960-5
- 5) Olivetto I, Gistri R, Petrone P, Pedemonte E, Vargiu D, Cecchi F (2003b). Maximum left ventricular thickness and risk of sudden death in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*;41:315-21
- 6) Basso C, Thiene G, Corrado D, Buja G, Melacini P, Nava A (2000). Hypertrophic cardiomyopathy: a paradigm for myocardial energy depletion. *Trends Genet*;19:263-268
- 7) Ho CY, Sweitzer NK, McDonough B, Maron BJ, Casey Sa, Seidman JG (2002). Assessment of diastolic function with Doppler tissue imaging to predict genotype in preclinical hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*;105:2992-2997
- 8) Olivetto I, Maron MS, Autore C, Lesser JR, Rega L, Casolo G, De Santis M, Quarta G, Nistri S, Cecchi F, Salton CJ, Udelson JE, Manning WJ, Maron BJ (2008a). Assessment and significance of left ventricular mass by cardiovascular magnetic resonance in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*;52:559-66
- 9) Adabag AS, Maron BJ, Appelbaum E, Harrigan CJ, Buys JL, Gibson CM, Lesser JR, Hanna CA, Udelson JE, Manning WJ, Maron MS (2008). Occurrence and frequency of arrhythmias in hypertrophic cardiomyopathy in relation to delayed enhancement on cardiovascular magnetic resonance. *J Am Coll Cardiol*;51:1369-74
- 10) Camici PG, Crea F (2007). Coronary microvascular dysfunction. *N Engl J Med*;356:830-40
- 11) Olivetto I, Cecchi F, Gistri R, Lorenzoni R, Chiriatti G, Girolami F, Torricelli F, Camici PG (2006). Relevance of coronary microvascular flow impairment to long-term remodeling and systolic dysfunction in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*;47:1043-8
- 12) Geisterfer-Lowrance AAT, Kass S, Tanigawa G, Vosberg H-P, McKenna W, Seidman CE (1990). A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a β cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell*, 62;999-1006
- 13) Thierfelder L, Watkins H, MacRae C, Lamas R, McKenna W, Vosberg H-P (1994). α -Tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy. A disease of the sarcomere. *Cell*; 77:701-712
- 14) Seidman C, Seidman JG (1995). Gene mutations that cause familial hypertrophic cardiomyopathy. In E.Haber (Ed). *Molecular cardiovascular medicine*: pp193-210. New York, Scientific American
- 15) Belus A, Piroddi N, Scellini B, Tesi C, Amati GD, Girolami F, Yacoub M, Cecchi F, Olivetto I, Poggesi C (2008). The familial hypertrophic cardiomyopathy-associated myosin mutation R403Q accelerates tension generation and relaxation of human cardiac myofibrils. *The Journal of Physiology*;586:3639-3644

- 16) Nagueh Sf, Kopelen HA, Lim DS, Zoghbi WA, Quinones MA, Roberts R (2000). Tissue Doppler imaging consistently detect myocardial contraction and relaxation abnormalities, irrespective of cardiac hypertrophy, in a transgenic rabbit model of human hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*;102:1346-1350
- 17) Maron MS, Olivotto I, Zenovich AG, Link MS, Pandian NG, Kuvin JT, Nistri S, Cecchi f, Udelson JE, Maron BJ (2006). Hypertrophic cardiomyopathy is predominantly a disease of left ventricular outflow tract obstruction. *Circulation*;114:2232-9
- 18) Sherrid MV, Gunsburg D, Sharma A (2000). Medical treatment of hypertrophic cardiomyopathy. *Current cardiology reports*; 2:148-153
- 19) Maron MS, Olivotto I, Betocchi S, Casey SA, Lesser JR, Losi mA, Cecchi F, Maron BJ (2003). Effect of left ventricular outflow tract obstruction on clinical outcome in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med*;348:295-303
- 20) Maron BJ, Spirito P, Shen W-K, Haas TS, Formisano F, Link MS (2007). Implantable cardioverter-defibrillators and prevention of sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy. *JAMA*; 298:405-12
- 21) Nishimura RA, Ommen SR (2007). Hypertrophic cardiomyopathy, sudden death, and implantable cardiac defibrillators: How low the bar?. *JAMA*;298:452-454 (Editorial)
- 22) Maron BJ (2003). Sudden death in young athletes . *N Engl J Med*;349:1064-1075
- 23) Eriksson MJ, Sonnesberg B, Woo A (2002). Long term outcome in patients with apical hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* ;39:638-645
- 24) Kitaoka H, Doi Y, Casey SA, Hitomi N, Furuno T, Maron BJ (2003). Comparison of prevalence of apical hypertrophic cardiomyopathy in Japan and the United States. *Am J Cardiology*;92:1183-1186
- 25) Ryan MP, Cleland JG, French JA, Joshi J, Choudhury L , Chojnowska L (1995). The standard electrocardiogram as a screening test for hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiology*; 76:689-694
- 26) Corrado D, Basso C, chiavoni M, Thiene G (1998). Screening for hypertrophic cardiomyopathy in young athletes. *N Engl J Med*;339:364-369
- 27) McLeod CJ, Acherman MJ, Nishimura RA, Tajik AJ, Gersh BJ, Ommen SR (2009). Outcome of patients with hypertrophic cardiomyopathy and a normal electrocardiogram. *J Am Coll Cardiol*;54:229-33
- 28) Olivotto I, Cecchi F, Casey SA, Dolara A, Traverse JH, Maron BJ (2001). Impact of atrial fibrillation on the clinical course of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*; 104:2517-2524
- 29) Maron BJ, Spirito P (2008). Implantable defibrillators and prevention of sudden death in hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*; 19:1118-1126
- 30) Lin G, Nishimura RA, Gersh BJ, Ommen SR, Ackerman M, Brady PA (2009). Device complications and inappropriate implantable cardioverter-defibrillators shocks in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Heart*;95:709-14
- 31) Sherrid MV, Daubert JP (2008). Risks and challenges of implantable cardioverter-defibrillators in young adults. *Progress in Cardiovascular Diseases*;51:237-263
- 32) Maron BJ, Doerer JJ, Haas TS, Tierney DM, Mueller FO (2009). Sudden deaths in young competitive athletes: analysis of 1866 deaths in the United States, 1980-2006. *Circulation*;119:1085-1092
- 33) Maron BJ, Dearani JA, Ommen SR, Maron MS, Schaff HV, Gersh BJ (2004). The case of surgery in obstructive hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*; 44:2044-2053
- 34) McLeod CJ, Ommen SR, Ackerman MJ, Weivoda PL, Shen WK, Dearani JA (2007). Surgical septal myectomy decreases the risk for appropriate implantable cardioverter defibrillator discharge in obstructive hypertrophic cardiomyopathy. *European Heart Journal*;28:2583-2588

- 35) Ommen SR, Maron BJ, Olivetto I, Maron MS, Cecchi F, Betocchi S (2005). Long-term effects of surgical septal myectomy on survival in patients with obstructive hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*; 46:470-476
- 36) Suggewiss H (2001). Current status of alcohol septal ablation for patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Current Cardiology Reports*;3:160-166
- 37) Woo A, Williams WG, Choi R, Wigle ED, Rozenblyum E, Fedwick K (2005). Clinical and echocardiographic determinants of long-term survival after septal myectomy in obstructive hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*;111: 2033-2041
- 38) Sorajja P, Valeti U, Nishimura RA, Ommen SR, rihal CS, Gersh BJ (2008). Outcome of alcohol septal ablation for obstructive hypertrophic cardiomyopathy . *Circulation*;118:131-139
- 39) Talreja DR, Nishimura RA, Edwards WD, Valeti US, Ommen SR, Tajik AJ (2004). Alcohol septal ablation versus septal myectomy: comparison of effects on atrioventricular conduction tissue. *J Am Coll Cardiol*;44:2329-2332
- 40) Nagueh SF, Bachinski LL, Meyer D, Hill R, Zoghbi WA, Tam JW (2001). Tissue Doppler imaging consistently detects myocardial abnormalities in patients with hypertrophic cardiomyopathy and provides a novel means for early diagnosis before and independently of hypertrophy. *Circulation*;104:128-130
- 41) Marion AJ (2008). Hypertrophic cardiomyopathy. In R.E Rachel & E.T Bope (Eds), *Conn's current therapy* : pp333-335. Philadelphia: SaundersElsevier
- 42) Ommen SR, Shah PM, Tajik AJ (2008). Left ventricular outflow tract obstruction in hypertrophic cardiomyopathy: past, present and future. *Heart*;94:1276-1281
- 43) Maltsev VA, Sabbah HN, Higgins RS, Silverman N, Lesch M, Undrovunas AI (1998). Novel, ultraslow inactivating sodium current in human ventricular cardiomyocytes. *Circulation*; 98:2545-52
- 44) Valdivia CR, Nagatomo T, Makielski JC (2002). Late Na current affected by α subunit isoform and β 1 subunit co-expression in HEK293 cells. *J Mol Cell Cardiol*; 34(8):1029-39
- 45) Xie LH, Chen F, Karagueuzian HS, Weiss JN (2009). Oxidative-stress-induced afterdepolarizations and calmodulin kinase II signaling. *Circ Res* 104(1):79-86
- 46) Nobel D, Nobel PJ (2006). Late sodium current in the pathophysiology of cardiovascular disease:consequences of sodium-calcium overload. *Heart* ;92 (suppl 4):iv1-iv5
- 47) Zara A, Belardinelli L, Shryock JC (2008). Pathophysiology and pharmacolgy of the cardiac "late sodium current". *Pharmacol Ther* ;119 (3):326-339
- 48) Undrovinas NA, Maltsev VA, Belardinelli L, Sabbah HN, Undrovinas A (2010). Late sodium current contributes to diastolic cell Ca^{2+} accumulation in chronic heart failure. *J Physiol Sci*; 60(4):245-57
- 49) Mc Cormack JG, Barr RL, Wolff AA, Lopaschk GD (1996), Ranolazine stimulates glucose oxidation in normoxic, ischemic and reperfusion ischemic rat hearts. *Circulation*; 93:135-42
- 50) Chaitman BR, Skettino SL, Parker JD, Harley P, Meluzin J, Kuch J, Pepine CJ, Wang W, Nelson JJ, Hebert DA, Wolff AA, for the MARISA Investigators (2004). Anti-ischemic effects and long-term survival during ranolazine monotherapy in patients with chronic severe angina . *J Am Coll Cardiol*;43:1375-82
- 51) Chaitman BR, Pepine CJ, Parker JO, Skopal J, Chumakova G, Kuch J, WANG W, Skettino SL, Wolff AA, for the CARISA investigators. (2004). Combination assessment of ranolazine with atenololo, amlodipine or diltiazem on exercise, tolerance and angina frequency in patients with severe chronic angina. *JAMA*;291:309-316
- 52) Antzlevitch C, Belardinelli L, Zygmunt AC, Burashnikov A, DiDiego JM, Fish JM, Cordeiro JM, Thomas G. (2004). Electrophysiological effects of ranolazine, a novel antianginal agent with antiarrhythmic properties. *Circulation*;110:904-910

- 53) Scirica BM, Morrow DA, Hod H, Murphy SA, Belardinelli L, Hedgepeth CM, Molhoek P, Verbeugt FW, Gersh BJ, McCabe cH et al (2007) , Effect of ranolazine, an antianginal agent with novel electrophysiological properties, on the incidence of arrhythmias in patients with non ST-segment elevation acute coronary syndrome: results from Metabolic Efficiency With Ranolazine for Less Ischemia in Non ST-Elevation Acute Coronary Syndrome Thrombolysis in Myocardial Infaction 36 (MERLIN-TIMI 36) randomized controlled trial. *Circulation*;116:1647-1652
- 54) Schram G, Zhang L, Derakhchan K, Ehrlich JR, Belardinelli L, Nattel S (2004). Ranolazine: ion-channel-blocking actions and in vivo electrophysiological effects. *Br J Pharmacol*;142: 1300-8
- 55) Undrovinas AI, Belardinelli L, Undrovinas A, Sabbah HN (2006). Ranolazine improves repolarization and contraction in left ventricular myocytes of dogs with heart failure by inhibiting late sodium current. *J Cardiovasc Electrophysiol* 17 Suppl 1:S169-S177
- 56) Song Y, Shryock JC, Wagner S, Maier LS, Belardinelli L (2006). Blocking late sodium current reduces hydrogen peroxide-induced arrhythmogenic activity and contractile dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther*;318: 214-222
- 57) Hwang E, Arcidi JM, Hale SL, Simkhovich BZ, Belardinelli L, Dhalla AK, Shryock JC, Kloner RA (2009). Ranolazine as cardioplegia additive improves recovery of diastolic function in isolated rat heart. *Circulation*;120 (Suppl 11):S16-21
- 58) Hayashida W, Eyll C, Rousseau MF, Pouleur H (1994). Effects of ranolazine on left ventricular regional diastolic function in patients with ischemic heart disease. *Cardiovasc Drug Ther*;8:741-7
- 59) Sossalla S, Wagner S, Rasenack EC, Ruff H, Weber SL, Schondube FA, Tirilomis T, Tenderich G, Hasenfuss G, Belardinelli L, Maier LS (2008). Ranolazine improves diastolic dysfunction in isolated myocardium from failing human heart-role of late sodium current and intracellular ion accumulation . *J Med Cell Cardiol*;45:32-43
- 60) Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA (2006). Controversies in ventricular remodeling. *Lancet*;367:356-367
- 61) Yang B, Lin H, Xiao J, Lu Y, Luo X, Li B, Zhang Y, Xu C, Bai Y, Wang H (2007). The muscle-specific micro-RNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat Med*;13:486-91
- 62) Johnson JN, Grifoni C, Bos JM, Saber-Ayad M, Ommen SR, Nistri S, Cecchi F, Olivetto I, Ackerman MJ (2011).prevalence and clinical correlates of QT prolongation in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J*;32:1114-1120
- 63) Wolk R (2000). Arrhythmogenic mechanism in left ventricular hypertrophy. *Europace*;2:216-223
- 64) Tomaselli GF, Rose J (2000). Molecular aspects of arrhythmias associated with cardiomyopathies. *Curr Opin Cardiol*;15:202-208
- 65) Richard S, Leclercq F, Lemaire S, Piot C, Nargeot J (1998). Ca²⁺ currents in compensated hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res*;37:300-311
- 66) Bailly P, Benitah JP, Mouchoniere M, Vassort G, Lorente P (1997). Regional alteration of the transient outward current in human left ventricular septum during compensated hypertrophy. *Circulation*;96:1266-1274
- 67) Rocchetti M, Freli V, Perego V, Altomare C, Mostacciuolo G, Zaza A (2006). Rate dependency of beta-adrenergic modulation of repolarizing currents in the guinea-pig ventricle. *J Physiol*;574:183-193
- 68) Atiga WL, Fananapazir L, McAreavey D, Calkins H, Berger RD (2000).Temporal repolarizing lability in hypertrophic cardiomyopathy caused by beta-myosin-heavy-chain gene mutations. *Circulation*;101:1237-1242

- 69) Gwathmey JK, Warren SE, Briggs GM, Copelas L, Feldman MD, Philips PJ, Callahan M, Schoen FJ, Grossman W, Morgan JP (1991). Diastolic dysfunction in hypertrophic cardiomyopathy. Effect on active force generation during systole. *J Clin Invest*;87:1023-1031
- 70) Schotten U, Koenigs B, Rueppel M, Schoendube F, Boknik P, Schmitz W, Hanrath P (1999). Reduced myocardial sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase protein expression in compensated primary and secondary human cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*;31:1483-1494
- 71) Okayama H, Hamada M, Kawakami H, Ikeda S, Hashida H, Shigematsu Y, Hiwada K (1997). Alterations in expression of sarcoplasmic reticulum gene in Dahl rats during the transition from compensatory myocardial hypertrophy to heart failure. *J Hypert*;15:1767-1774
- 72) Pieske B, Maier LS, Schmidt-Schweda S (2002). Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ load in human heart failure. *Basics Res Cardiol*;97(suppl1):163-171
- 73) Sipido KR, Volders PG, de Groot SH, Verdonck F, Van der Werf F, Wellens HJ, Vos MA (2000). Enhanced Ca²⁺ release and Na/Ca²⁺ exchange activity in hypertrophied canine ventricular myocytes: potential link between contractile adaptation and arrhythmogenesis. *Circulation*;102:2137-2144
- 74) Terracciano CM, Philipson KD, MacLeod KT (2001). Overexpression of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger and inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in ventricular myocytes from transgenic mice. *Cardiovasc Res*;49:38-47
- 75) Isenberg G (2001). How can overexpression of Na⁺/Ca²⁺ exchanger compensate the negative inotropic effects of downregulated SERCA?. *Cardiovasc Res*;49:1-6
- 76) Weisser-Thomas J, Piacentino V, Gaughan JP, Margulies K, Houser SR (2003). Calcium entry via Na/Ca²⁺ exchange during the action potential directly contributes to contraction of failing human ventricular myocytes. *Cardiovasc Res*;57:974-985
- 77) Schotten U, Voss S, Wiederin TB, Voss M, Schoendube F, Hanrath P, Schumacher C (1999). Altered force-frequency relation in hypertrophic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol*;94:120-127
- 78) Sherrid MV, Barac I, McKenna WJ, Elliott PM, Dickie S, Chojnowska L, Casey S, Maron BJ (2005). Multicenter study of efficacy and safety of disopyramide in obstructive hypertrophic cardiomyopathy. *J.Am.Coll.Cardiol*;45:1251-1258
- 79) Robinson P, Mirza M, Knott A, Abdulrazzak H, Willot R, Marston S, Watkins H, Redwood C (2002). Alterations in thin filament regulation induced by a human cardiac TroponinT mutant that causes dilated cardiomyopathy are distinct from those induced by Troponin mutants that causes hypertrophic cardiomyopathy. *J Biol Chem*;277:40710-40716
- 80) Javadpour MM, Tardiff JC, Pinz I, Ingwall JS (2003). Decreased energetics in murine hearts bearing the R92Q mutation in cardiac troponin T. *J Clin invest*;112:768-775
- 81) Huke S, Knollmann BC (2010). Increased myofilament Ca²⁺ sensitivity and arrhythmia susceptibility. *J Mol Cell Cardiol*;48:824-833
- 82) Zhang T, Brown JH (2004). Role of Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res*;63:476-486
- 83) Fan P, Coppini R, Liang Z, Cerbai F, Shyock JC, Mugelli A, Yao L, Belardinelli L (2011). Role of increased Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and late Na⁺ current in the diastolic dysfunction and electrical instability of human hypertrophic cardiomyopathy. *Heart Rhythm*;8:1821
- 84) Semsarian C, Ahmad I, Giewat M, Georgakopoulos D, Schmitt JP, McConnell BK, Reiken S, Mende AR, Kass DA (2002). The L-type calcium inhibitor diltiazem prevents cardiomyopathy in a mouse model. *J Clin Invest*;109:1013-1020
- 85) Gersh BJ, Maron BJ, Bonow RO, Dearani JA, Fifer MA, Link MS, Naidu SS, Nishimura RA, Ommen SR, Rakowski H, et al (2011). 2011 ACCF/AHA Guidelines for the diagnosis and treatment of

hypertrophic cardiomyopathy: Executive Summary: A Report from American College of Cardiology Foundation /American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*;124:2761-2796

- 86) Rastogi S, Sharov VG, Myshras S, Grupta RC, Blacjbun B, Belardinelli L, Stanley WC, Sabbah HR (2008). Ranolazine combined with enalapril or metoprolol prevents progressive LV dysfunction and remodeling in dogs with moderate heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* ;295:H2149-H2155

Ringraziamenti

Si ringraziano per l'aiuto ed i preziosi consigli prestati durante lo svolgimento di questo studio il Prof. Corrado Poggesi , il Prof. Franco Cecchi, il Dott. Iacopo Olivotto, il Dott. Raffaele Coppini e la Dott.ssa Cecilia Ferrantini